

712

ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

BEGRÜNDET VON
J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPEL

HERAUSGEGEBEN VON

H. L. JENSEN
LYNGBY

C. B. VAN NIEL
PACIFIC GROVE

R. NILSSON
UPPSALA

G. PIEKARSKI
BONN

E. G. PRINGSHEIM
GÖTTINGEN vorm. CAMBRIDGE

W. H. SCHOPFER
BERN

H. TAMIYA
TOKIO

T. WIKÉN
DELFT

UND DEN SCHRIFTFLEITERN

A. RIPPEL-BALDES
GÖTTINGEN

R. HARDER
GÖTTINGEN

28. BAND



SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

1957/58

ARCHIV
FÜR
MIKROBIOLOGIE

ALLE RECHTE VORBEHALTEN

Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages
ist es auch nicht gestattet, einzelne Beiträge oder Teile daraus
auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen

Springer-Verlag Berlin · Göttingen · Heidelberg

Printed in Germany

Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw.
in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der
Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-
Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt
werden dürften

Inhaltsverzeichnis des 28. Bandes

v. 28

1. Heft

(Abgeschlossen am 24. Oktober 1957)

Seite

MILLER, J. D. A., and G. E. FOGG, Studies on the Growth of Xanthophyceae in Pure Culture. I. The mineral nutrition of <i>Monodus subterraneus</i> Petersen. With 6 Figures in the text	1
BENDER, H., Studien zum L-Cyclus der Bakterien. (Nach Untersuchungen an <i>Proteus vulgaris</i> unter dem Einfluß von Penicillin.) Mit 3 Textabbildungen	18
BENDER, H., Studien zum Gestaltwandel der Bakterien. (Bildung sarcina-ähnlicher Formen bei einem gramnegativen, unbeweglichen Stäbchen.) Mit 8 Textabbildungen.	34
SCHMIDT-LORENZ, W., und A. RIPPEN-BALDES, Wirkung des Sauerstoff-Partialdrucks auf Wachstum und Stickstoffbindung von <i>Azotobacter chroococcum</i> Beij. Mit 9 Textabbildungen	45
KHAMBATA, S. R., and J. V. BHAT, A Contribution to the Study of the Intestinal Microflora of Indian Earthworms	69
PRÄUSER, H., Untersuchungen an <i>Microthamnion kützingerianum</i> Naeg. Mit 2 Textabbildungen.	81
DÖLLE, H., Untersuchungen an farblosen und rhodomycinbildenden Stämmen von <i>Streptomyces purpurascens</i> Lindenbein. Mit 7 Textabbildungen . . .	89

2. Heft

(Abgeschlossen am 30. November 1957)

STURM, G., Die Wirkung hoher hydrostatischer Drücke auf Süßwasseralgen. Mit 8 Textabbildungen	109
TERRANOVA, T., und P. DE GREGORIO, Das Bakterien/L-Formen-Verhältnis in den aus Mäusen isolierten <i>Proteus</i> - und <i>Salmonella</i> -Stämmen	126
MARKOV, K. Iw., und G. K. SAEV, Veränderungen des elektrokinetischen Potentials bei penicillinresistenten und penicillinempfindlichen Staphylokokken nach der Bearbeitung mit Fermenten. Mit 2 Textabbildungen	130
WITTMANN, H., Über die Carotinoide von <i>Chlorobium chlorochromatii</i> n. spe.	136
PETRAS, E., Über die Wirkung von Kobalt-Ionen auf das Cytochromsystem und die Katalase-Aktivität von <i>Proteus vulgaris</i> Hauser. Mit 2 Textabbildungen	138
JENSEN, H. L., Biological Transformation of Thiourea	145
HARDER, R., und B. BEDERKE, Über Wachstumsversuche mit Rot- und Grünalgen (<i>Porphyridium cruentum</i> , <i>Trailliella intricata</i> , <i>Chlorella pyrenoidosa</i>) in verschiedenfarbigem, energiegleichen Licht. Mit 9 Textabbildungen . . .	153
STEINER, M., und H. KATNG: Harnstoffassimilation mit und ohne Ureasewirkung bei Mikroorganismen. (<i>Endomycopsis vernalis</i> , <i>Torulopsis utilis</i> , <i>Willia anomala</i>)	173
NOLTE, E.-M., Untersuchungen über Ernährung und Fruchtkörperbildung von Myxobakterien. Mit 5 Textabbildungen	191

3. Heft

(Abgeschlossen am 31. Dezember 1957)

	Seite
HRUSCHKA, H., Untersuchungen über den Schwefelumsatz von <i>Aspergillus niger</i> . Mit 10 Textabbildungen	219
CAPRIOTTI, A., <i>Torulaspora nilssonii</i> nov. spec. A new yeast from Swedish soils. With 6 figures in the text	247
GIRBARDT, M., Über die Substruktur von <i>Polystictus versicolor</i> L. Mit 16 Textabbildungen	255
FUHS, G. W., Bau, Verhalten und Bedeutung der kernäquivalenten Strukturen bei <i>Oscillatoria amoena</i> (Kütz.) Gomont. Mit 37 Textabbildungen . .	270
FUCHS, W. H., und A. GAERTNER, Untersuchungen zur Keimungsphysiologie des Schwarzrostes <i>Puccinia graminis tritici</i> (Pers.) Erickss. u. Henn. Mit 6 Textabbildungen	303
LYR, H., Die Induktion der Laccase-Bildung bei <i>Collybia velutipes</i> Curt. Mit 12 Textabbildungen	310

4. Heft

(Abgeschlossen am 24. Januar 1958)

GREVE, E., Untersuchungen über das Atmungsverhalten von Hefen. II. Die Bedeutung der Zuckerkonzentration. Mit 2 Textabbildungen	325
CAPRIOTTI, A., Neue Hefen, isoliert aus Böden Spaniens. II. <i>Torulaspora franciscae</i> nov. spec. Mit 4 Textabbildungen	338
CAPRIOTTI, A., <i>Debaryomyces castellii</i> nov. spec. Eine neue Hefe aus Boden Schwedens. Mit 5 Textabbildungen	344
SCHAUZ, K., Untersuchungen über UV-Resistenz bei <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Mit 11 Textabbildungen	349
DREWS, G., Die granulären Einschlüsse der Mycobakterien. Mit 9 Textabbildungen.	369
WIELAND, TH., G. GRISS und B. HACCUS, Untersuchungen zur mikrobiellen Benzoloxydation. I. Nachweis und Chemismus des Benzolabbaus. Mit 6 Textabbildungen.	383
HACCUS, B., und O. HELFRICH, Untersuchungen zur mikrobiellen Benzoloxydation. II. Beschreibung und systematische Stellung benzolabbauender Mikroorganismen. Mit 4 Textabbildungen	394
SCHMIEDEKNECHT, M., Morphologische Untersuchungen zur Frage der Rassenbildung bei <i>Helminthosporium papaveris</i> Saw. Mit 6 Textabbildungen . .	404
NAUMANN, K., Über das Verhalten verschiedener morphologischer Rassen von <i>Helminthosporium papaveris</i> Saw. gegenüber unterschiedlich aktiven Strahlenpilzstämmen. Mit 10 Textabbildungen	417
Berichtigung zu der Arbeit von R. NÄVEKE (Band 27)	442
Autorenverzeichnis	443

(From the Department of Botany, University College, London)

Studies on the Growth of Xanthophyceae in Pure Culture

I. The mineral nutrition of *Monodus subterraneus* Petersen

By

J. D. A. MILLER and G. E. FOGG

With 6 Figures in the text

(Eingegangen am 7. April 1957)

It is generally believed that members of the *Xanthophyceae* (*Heterokontae*) are distinguished from other algae as much by metabolic peculiarities as by morphological features but, in point of fact, little is known of their physiology or biochemistry.

The accessory photosynthetic pigments differ from those of other algal classes in that the few species examined have been found to contain chlorophyll e but no chlorophyll b (STRAIN 1951). According to JAMIKORN (1954) four species of *Xanthophyceae* examined by her contained β -carotene, lutein, violaxanthin and neoxanthin in the same proportions as found in the *Chlorophyceae*. These findings conflict somewhat with those of STRAIN (1951). There appears to be no quantitative evidence to support the often repeated statement that the *Xanthophyceae* contain a high proportion of carotenoids as compared with the *Chlorophyceae*. Starch, as detected by the usual microchemical tests, is absent from the *Xanthophyceae*, its place as a reserve substance being perhaps taken by the chemically ill-defined substance leucosin (FRITSCH 1935). The cell walls of two species have been shown by x-ray analysis to contain cellulose (NICOLAI and PRESTON 1952) and in many species the membranes may be silicified (FRITSCH 1935). Fat accumulation has been regarded as especially characteristic of the class but quantitative studies have shown no essential difference in this respect from the *Chlorophyceae* (COLLYER and FOGG 1955). The amino-acid composition of the bulked proteins of a xanthophycean alga has been found not to differ significantly from those of algae belonging to other groups (FOWDEN 1954) and not to include the uncommon α - ϵ -diaminopimelic acid (WORK and DEWEY 1953). From studies with *Vaucheria* sp., which from its pigmentation, lack of starch, and flagellation (GREENWOOD, MANTON and CLARKE 1957), evidently belongs to the *Xanthophyceae*, it appears that the path of carbon in photosynthesis by members of this class is essentially the same as that in other plants (NORRIS, NORRIS and CALVIN 1955).

More extensive physiological and biochemical investigation of the *Xanthophyceae* is desirable not only from the point of view of comparative biochemistry but because members of this class are sometimes quantitatively important in the micro-floras of freshwaters and soils. The purpose of this paper is to describe some general studies on the growth and mineral nutrition of *Monodus subterraneus* Petersen. These investigations were carried out with the object of defining the conditions for

maximum growth rate and cell crop, prior to a detailed investigation of certain aspects of its metabolism.

In size, structure and reproduction, *Monodus* is the xanthophycean equivalent of *Chlorella* in the *Chlorophyceae*. It is a non-motile unicellular alga, the adult cells normally measuring about $5\mu \times 9\mu$. Cell division results in the formation of two or four autospores. No sexual process or motile stages have been observed. *M. subterraneus* was first described from a sandy agricultural soil in Denmark (PETERSEN 1932) but the strain used by us was isolated from wet rocks in a stream near Marion, Connecticut, by Dr. R. A. LEWIN. We have confirmed that chlorophyll b (BELCHER and FOGG 1955) and starch are absent in appreciable quantities from this alga, and have no doubt that it is correctly placed in the *Xanthophyceae*. Studies on fat accumulation in *M. subterraneus* have already been reported (COLLYER and FOGG 1955).

Methods

1. *Stock cultures.* *M. subterraneus* was found to grow satisfactorily on Chu's medium no. 10 (CHU 1942) with iron supplied as a ferric citrate-citric acid mixture (ROPHE 1948). Initial experiments with stagnant cultures in cotton wool plugged 100 ml. Pyrex conical flasks showed that growth was more vigorous in Chu no. 10 medium at five times the normal concentration ("Chu no. 10 \times 5"), but rather poorer on FOGG's (1949) *Anabaena* medium with 0.02% potassium nitrate, and much poorer in the more concentrated standard media such as the *Chlorella* media of PEAR-SALL and LOOSE (1937) and MYERS and CLARK (1944). On the other hand the *Navicula* medium of LEWIN (1953) gave growth about equal to that in Chu no. 10 \times 5. In making up all media Pyrex distilled water was employed, and "Analar" chemicals were used where available.

The improved growth in greater than normal concentrations of Chu no. 10, in contrast to the poorer growth in most other concentrated media, led to the selection of this medium as starting-point in the search for a mineral solution that would give rapid growth and high cell crop. Thus for maintaining stock cultures, slopes of Chu no. 10 solidified with 1.5% agar were employed. Serial transfers were made on to fresh slopes at approximately monthly intervals. Inoculations were also made into tubes of liquid medium, and cells from such stagnant liquid cultures, 12–15 days old, were used as inocula for all the experimental work to be described.

2. *Temperature.* The organism grew well at 25°C, and all experiments were carried out at this temperature. The range of temperature tolerated by the organism has not been investigated, though it is known to remain viable after several hours at 34°C.

3. *Culture techniques.* Aseptic precautions were observed throughout. Large discrepancies between replicate cultures were nearly always traceable to the contamination of one of them by bacteria or fungi, so after each experiment bacteriological media were inoculated with the algal suspensions, and the results obtained from contaminated cultures were discarded.

Duplicate or triplicate cultures were used for each treatment and, except where otherwise stated, the algae were grown in 100-ml. cotton wool plugged conical flasks immersed in a constant-temperature tank at 25.0°C. and arranged in a circle around a 150-watt pearl tungsten filament lamp so that the light intensity at the cultures was approximately 3600 metre-candles.

In early experiments the cultures were stagnant. Later a shaking mechanism was added, pivoted vertically about the lamp, and accommodating up to 18 vessels. This was shaken through an amplitude of 10 cm. at the rate of 88 oscillations per min. by means of a constant-speed electric motor. The rate of growth in Chu no. 10 in continuously shaken vessels

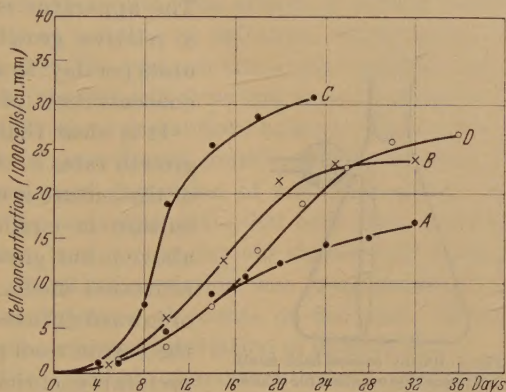


Fig. 1. Growth of *Monodus subterraneus* in Chu no. 10 medium at 25°C under different culture conditions: (A) stagnant culture in conical flasks, (B) continuously shaken flasks, (C) aerated and shaken flasks, (D) aerated tubes. The experiments were performed at different times, but similar inocula were used

was considerably higher than in stagnant culture, as shown in Fig. 1 which compares growth in Chu no. 10 in different experiments, the inoculum being similar (about 100 cells per mm³.) in each case. Subsequently, 100 ml. conical flasks, modified by the addition of an aeration tube drawn out to a fine orifice, were employed (see Fig. 2). Cultures were aerated with air + 1% carbon dioxide at a rate of 3 bubbles per sec. (10 ml. per min.)¹. In order to observe the effect of aeration without shaking, an experiment was performed with culture tubes 2.5 cm. in diameter and 15.0 cm. long, each fitted with a rubber bung carrying an aeration tube passing almost to the bottom and an outlet filter. Aeration was vigorous and to prevent evaporation the air was first passed through humidifying bottles. Despite aeration at 6–8 bubbles per sec. a proportion of the cells remained settled out on the bottom, and early growth was poorer than in cultures that were shaken but not aerated. Fig. 1 shows

¹ In this paper the term *aeration* is reserved for the procedure of passing air through culture vessels.

that there is a distinct advantage in shaking "aerated" cultures of *Monodus*.

A continuous culture apparatus similar in basic design to that described by MYERS and CLARK (1944) has also been used. This provides vigorous aeration with a humidified gas mixture, the composition of which may be varied, to a culture grown in a vessel annular in section, and maintained at 25.0°C by means of a water-jacket. Thorough stirring of the culture can be achieved in a vessel of this shape and the rate of growth obtainable is equal to that in shaken conical flasks with aeration.

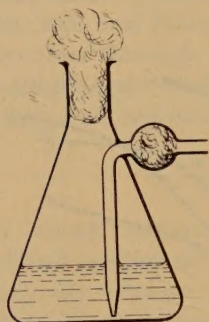


Fig. 2. 100 ml. conical flask modified to provide aeration for shaken cultures. The bulb, as well as the neck, is plugged with cotton wool

The apparatus is normally operated to give a relative growth rate of about $0.25 \log_{10}$ units per day, in a culture maintained at a cell concentration of 120,000—140,000 per mm^3 .

It is clear that, in order to maintain high growth rates in *Monodus*, thorough agitation of the culture is necessary. Shaking keeps the culture in equilibrium with the gas phase above it but growth, especially in more concentrated media, is then limited by the rate of inward diffusion of carbon dioxide through the cotton wool plug, so that a supply of air, preferably enriched with carbon dioxide, is required to maintain high growth rates. The combination of shaking and a slow flow of air

through the vessel seems preferable to the use of static vessels with vigorous aeration because the wastage of carbon dioxide is less and, evaporation being negligible, there is no necessity for a humidifying system for the air. Thus a flask can be easily removed for aseptic sampling in a sterile chamber.

4. *Estimation of growth.* Although it is unicellular, *M. subterraneus* presents certain difficulties when quantitative estimation of growth is attempted. In early stages of growth large cell aggregates form which are almost impossible to break down completely, even with vigorous shaking of the sample, and when the culture vessel is shaken or aerated many cells adhere to the glass walls above the medium and are difficult to dislodge. A possible solution to a part of this problem is the treatment of the vessels with a silicone to render the glass unwettable: preliminary results with the continuous culture apparatus indicate that when this is done the deposition of cells is greatly reduced. This deposition of cells on the sides of the vessel above the medium sometimes persists into later stages of growth in media which are rather unsuitable for the organism. It has been noticed in several mineral media, and most markedly when growing the alga on tryptophane as sole nitrogen source (MILLER and FOGG, in preparation).

Growth was estimated in the following experiments by means of cell counts. Estimation from optical density of cell suspensions was found to be unreliable owing to the large variation in the production of pigments according to the composition of the medium and the phase of growth: for instance the alga changes colour during growth in Chu no. 10 from an almost chlorophycean green to yellow when growth is complete, yet retains its greenness in some of the concentrated media that have been devised.

The following technique was evolved to minimize the error when studying growth by means of cell counts. The cells in a culture vessel were suspended as thoroughly as possible by agitation, and a sample of 0.5 ml. withdrawn with a pipette. This was run into a small specimen tube and thoroughly shaken, and 500—600 cells from this suspension counted with a haemocytometer. Despite these precautions however, the accuracy of cell counts in early stages of growth was considerably lower than in older cultures where clumping and deposition of cells had ceased. To determine the accuracy of the technique 500—600 cells were counted from each of 16 samples taken from a four-day-old shaken and aerated culture in Chu no. 10. The standard deviation was found to be more than 8% of the mean. A similar series of counts on the same culture after a further 12 days showed a standard deviation of exactly 5%.

In early experiments the general characteristics of growth in different media were observed by occasional cell counts, but when the improved culturing technique allowed of a longer period of exponential growth, its rate was determined by counting on the 2nd, 4th, 6th, 8th and 10th days. The period for which exponential growth was maintained was determined by interpolation from graphs, and the relative growth rate (R) during this period was calculated by the method of least squares, as the regression of \log_{10} of cell number per unit volume on time in days. Final yield in terms of both cell number and dry weight per unit volume were also observed. All these aspects of growth were considered when the suitability of a culture medium was assessed.

Results

1. Pattern of growth. When a mineral medium is inoculated with *Monodus* cells from a stagnant Chu no. 10 culture 12—15 days old, there is a burst of cell division within a few hours in which most of the cells take part. There is then apparently no more division for up to 36 hrs. while the autospores enlarge, and thereafter cell division rapidly becomes out of phase and the curve is no longer stepwise. Fig. 3 shows early growth in detail in two shaken and aerated flasks of Chu no. 10. Growth here was exponential until about the 8th day, the regression line giving a value for R of 0.252 for the period between the 2nd and 8th days. This

is somewhat higher than values (about 0.23) normally obtained in Chu no. 10, and can be attributed to the much more frequent resuspension of deposited cells and breakdown of clumps before sampling.

2. *Reaction.* Growth occurred in Chu no. 10 at p_{H} s between 3.0 and 9.5, the full range tested. There was no significant difference in R or in

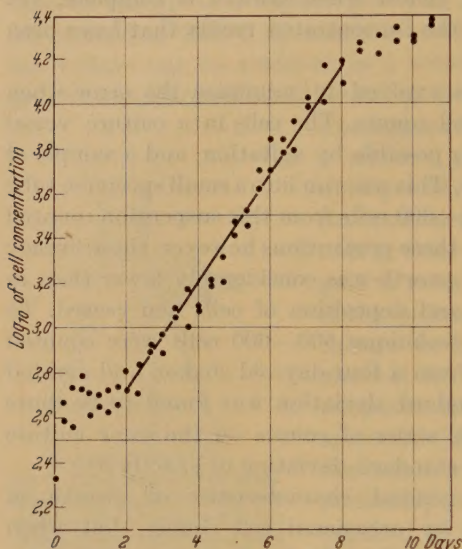


Fig. 3. Detailed growth curve of *Monodus* in two shaken and aerated flasks of Chu no. 10 medium. The regression line fitting the points from the 2nd to the 8th days is shown

final yield at initial p_{H} s of between 6.0 and 7.7. Growth at p_{H} 3.0 was extremely slow, but a cell concentration of 7600 per mm^3 was ultimately reached. Culture media containing nitrate were therefore adjusted initially to p_{H} 6.0–6.2, when the final p_{H} was in no case higher than about 8.9.

3. *Iron requirement.* Growth was normal in Chu no. 10 with one tenth of the usual concentration of ferric citrate, at initial p_{H} s of up to 8.5 (the highest tested), demonstrating that 10^{-6} m ferric citrate provides sufficient available iron for the organism even at high p_{H} s. 5×10^{-6} m ferric chloride was also tested as an iron source, and was found

to support growth at p_{H} 8.5 about equal to that with ferric citrate. The latter salt has, however, been employed exclusively in the work to be described.

4. *Growth with high nitrate concentrations and the effects of cation ratios.* Attempts to improve growth in Chu no. 10 by increasing the nitrate concentration tenfold or twentyfold, using calcium nitrate prepared from "Analar" reagents, were unsuccessful. There was little improvement unless the dibasic potassium phosphate was increased in proportion, in which case the growth characteristics resembled those in Chu no. 10 \times 5. It was at first assumed that the phosphorus requirement of the organism was high, its optimal nitrogen atom: phosphorus atom ratio being near to that in Chu no. 10 (8.5). Increase of the nitrogen concentration by addition of sodium nitrate, however, was found to give much improved growth without the addition of phosphate. This fact suggested that the high calcium concentration was unfavourable: the improved growth consequent upon the increase of both calcium nitrate and potassium phosphate could thus be due

at least partially to an antagonism between the calcium and potassium ions.

The effect of varying monovalent and divalent cation concentrations in a medium of otherwise constant composition was therefore studied in detail, using cultures with shaking and aeration. A basal medium resembling Chu no. 10 was used, containing the usual concentration of dibasic potassium phosphate (0.001%) and hydrated magnesium sulphate (0.0025%), ferric citrate, and trace elements (boron, manganese, molybdenum, cobalt, copper and zinc). Sodium carbonate and silicate were both omitted. Nitrogen at 20 times the normal concentration was supplied as various mixtures of sodium and calcium nitrates (see Table 1). Relative growth rate, final cell concentration and dry weight per unit volume were ascertained and plotted as in Fig. 4.

It is seen that there was a marked optimal range for all aspects of growth on the high-sodium side, suggesting an inhibition by high calcium-ion concentration (above about the 1.7 milligram-atom/litre in medium E), or an unfavourable effect of a

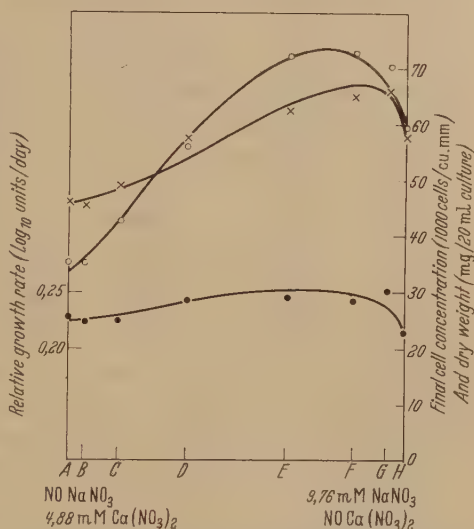


Fig. 4. Growth in basal medium containing various mixtures of sodium and calcium nitrates. (• relative growth rate, ○ final cell concentration, and × final dry weight)

low sodium : calcium ratio or monovalent : divalent cation ratio. The R values in media D, E, F and G were higher by a statistically significant amount than that in medium B. Greater differences appeared in the final dry weights and cell concentrations in the different media, although there was not a constant proportionality between these two aspects of growth: 10^7 cells in media A and B, where relative growth rates and final yields were poor, weighed about 0.64 mg. compared with only 0.43 mg. in medium F.

Some growth took place in absence of calcium, except that present as impurity, exponential growth being of short duration and at a low rate, although the final production of cells was remarkably high. The organism has been maintained through 10 subcultures in medium nominally free from calcium, but critical work on the essentiality of this element using purified salts has not yet been attempted.

The curves in Fig. 4 may be interpreted as a response to increasing calcium concentration up to about that in medium F, implying a rather large calcium requirement of the order of 0.02 micro-microgram-atom per cell if the amount of added calcium is divided by the number of cells produced in excess of that in medium H, whereas later work with the standard medium indicates that the calcium requirement is much smaller than this, and probably less than 0.0005 $\mu\mu\text{g.}$ -atom per cell. Inhibition seems to occur at the calcium concentration in medium E (only $2\frac{1}{2}$ times

Table 1. *Composition of high-nitrate basal media and p_{H} changes during growth*

Medium	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ concentration (millimolar)	NaNO_3 concentration (millimolar)	Monovalent: divalent cation ratio	Initial p_{H}	Final p_{H}
A	4.880	0	1:43.3	6.0	7.8
B	4.636	0.488	1:7.9	6.0	8.0
C	4.148	1.464	1:2.7	6.0	8.3
D	3.172	3.416	1.1:1	6.0	8.5
E	1.708	6.344	3.6:1	6.0	8.8
F	0.732	8.296	10.1:1	6.0	8.9
G	0.244	9.272	27.2:1	6.0	8.8
H	0	9.760	97.2:1	6.0	8.9

the concentration required for maximum growth under these conditions). This is unlikely to be a direct toxic effect of calcium, though MAST and PACE (1939) found inhibition of the growth of the colourless alga *Chlomonas paramecium* by calcium salt concentrations above millimolar. The inhibition by high calcium in the present experiment may alternatively be an indirect effect due to adsorption of a nutrient such as iron on to a precipitate formed as the medium became alkaline, but this also is unlikely since no precipitation was noticed in the high-calcium media, the p_{H} rose less in them than in the high-sodium media, and the early stages of growth were also poorer than in high-sodium media.

Cation balance seems at present the most likely explanation of the phenomenon. The importance of this balance for the growth of micro-organisms has been stressed by several authors (see Discussion). Since growth in absence of sodium showed no pronounced difference from that at low concentrations it appears that a specific antagonism of calcium by sodium is not involved, but, rather, an antagonism between monovalent and divalent cations. The optimal monovalent: divalent cation ratio for the organism appears to lie between about 10 and 27:1.

A low monovalent: divalent cation ratio may interfere with uptake of ions by reducing cell permeability. In this connexion it is interesting to note that the high-sodium cultures (including the calcium-free medium H) developed a much brighter green than the others which soon became yellowish. A similar loss of greenness was noticed later in the

standard medium at low nitrogen concentrations, and suggested that absorption of the nitrate is interfered with in the high-calcium media. Unfortunately a quantitative study of these differences in pigmentation has not yet been made owing to the extreme difficulty of extracting all the pigment from *Monodus*.

Thus in designing a standard medium with which to determine mineral requirements and biochemical characteristics of *Monodus*, it was decided to keep the cation balance within the optimal range indicated by this experiment, to use sodium or potassium nitrate instead of calcium nitrate, and to find whether abundant growth could be obtained without exceeding a concentration of 1.7 mg.-atom calcium/litre.

5. *Potassium requirement.* In order to rule out the possibility of an interference with potassium uptake by a high calcium concentration, another experiment was performed in which the sodium and potassium

Table 2. *Sodium and potassium content of six variants of basal medium E, with growth obtained*

Medium	Na concentration (mg.-atom/l)	K concentration (mg.-atom/l)	Relative growth rate (log ₁₀ unit/day)	Mean final cell count (cells/mm ³)
1	6.460	0	—	13960
2	6.402	0.057	0.251	60730
3	6.345	0.115	0.253	65280
(Medium E)				
4	4.230	2.230	0.245	63060
5	2.115	4.345	0.248	63200
6	0	6.460	0.243	62440

concentrations were varied inversely in the basal medium E. The compositions of the six variants of medium E are given in Table 2, with the relative growth rates and final cell concentrations obtained with these media. No improvement in growth resulted where some or all of the sodium was replaced by potassium: there was no significant difference in the final cell concentrations in media 2—6, although the R in medium 2 was actually significantly higher than that in medium 6. Thus growth was not diminished by reducing the potassium concentration to one-half of the original value in medium E, though it was poor in absence of added potassium, exponential growth in this case lasting only 3—4 days with the potassium carried over with the inoculum or introduced as impurity. From the number of cells produced in excess of that in the potassium-free controls by the smallest addition of potassium, a maximum requirement of 0.00122 μ g.-atom K/cell by *Monodus* was calculated. This very small requirement suggested that sodium nitrate could probably be successfully employed as nitrogen-source in the standard medium.

6. *Phosphate tolerance.* The N:P ratio in Chu no. 10 is 8.5:1. Cell production in stagnant culture was found not to be significantly lower at one-half of the normal dibasic potassium phosphate concentration, the potassium being made up to the normal concentration with potassium chloride, and only slightly poorer at one-quarter of the usual phosphate content (N:P = 34.0). Thus the optimal N:P ratio for the organism was assumed to lie between 8.5 and 34.0:1.

With this and the previous results as a basis, an attempt was made to devise a medium, more concentrated than those based on Chu no. 10, which would support maximum growth of *Monodus*. Detailed investigation of the nitrogen and phosphorus requirements was afterwards carried out with this medium, and is reported in § 9. First, however, the tolerance of the organism to phosphate concentration was investigated by attempting to grow it in the basal medium E made up in 0.005 m, 0.01 m, and 0.02 m potassium dihydrogen phosphate buffer adjusted to p_H 7.0. Only poor growth occurred in presence of 0.005 m phosphate, and no growth at all in the higher concentrations. This explained the lack of growth in the media of MYERS and CLARK, and of PEARSALL and LOOSE, in which the phosphate concentrations are respectively 0.009 m and 0.067 m.

7. *A concentrated standard medium.* In designing a concentrated medium, the relatively low figure of 0.00115 m dibasic potassium phosphate (0.02%, the concentration in LEWIN's medium in which *M. subterraneus* grew satisfactorily) was selected. The potassium concentration this gave would be adequate to support a cell population of over 2 million per mm^3 . The magnesium sulphate concentration of 0.0008 m in that medium was also employed. A sodium nitrate concentration of 0.02 m was taken since the N:P ratio of 17.4:1 which this gave was considered favourable, from the above evidence. A calcium chloride concentration of 0.00063 m was used, this being considerably below the concentration suspected of being inhibitory. It gave a monovalent:divalent cation ratio of 15.6:1 in the medium. Twice the quantities of trace elements and ferric citrate used in modified Chu no. 10 were employed. The addition of about 0.6 ml. normal hydrochloric acid/litre gave a p_H of 6.0 after autoclaving.

Growth in this medium was then studied, to assess its value in producing algal material for biochemical investigations and as a medium for mass culture.

8. *Dilution and concentration of the standard medium.* An experiment was conducted with shaken and aerated cultures of the standard medium at the concentration derived in the above manner, and at 3/10, 3 times and 10 times this strength. Some precipitation occurred in this last medium during autoclaving and more hydrochloric acid was added aseptically, bringing the initial p_H to about 5.7. As usual each flask was inoculated with about 100 cells per mm^3 .

The principal results are shown in Fig. 5a. They indicate that the medium is very suitable for *Monodus*, relative growth rate (approximately $0.25 \log_{10}$ units per day) being about the same as that obtained in the optimal basal media. In the standard medium, however, exponential growth continues for 10—11 days in these culture conditions, and final cell concentrations are very much higher than any previously attained (up to 600,000 cells per mm^3 , compared with 75,000 in optimal basal media and 30,000 in Chu no. 10 under identical culture conditions).

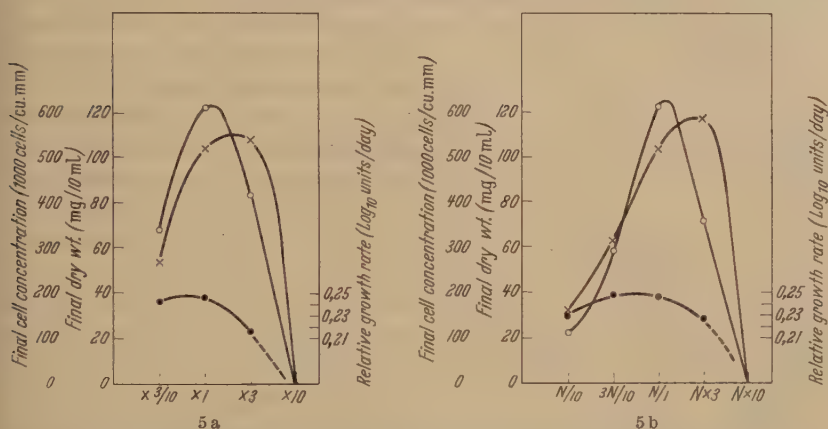


Fig. 5a. Growth in various dilutions and concentrations of the standard medium

Fig. 5b. Growth in the normal-strength standard medium with different concentrations of sodium nitrate. (• relative growth rate, ○ final cell concentration, and × final dry weight)

The best growth in terms of the relative growth rate and final cell concentration occurred in the standard medium at normal strength. At triple strength the final dry weight of cells per 10 ml. of culture was higher than in normal strength but the final cell number was markedly lower, indicating an inhibition of cell division. There was virtually no growth in the medium $\times 10$.

Changes in p_H during growth were not so great in these media as in the earlier less buffered media. The final p_H in standard medium $\times 3/10$ was 7.7, that in normal concentration 8.2, and that in $3 \times$ normal concentration 8.6.

Concurrently with this experiment another was carried out with the standard medium containing various concentrations of sodium nitrate above and below the normal concentration of 0.02 m. In each treatment the calcium chloride was increased or decreased to preserve the cation balance. The results are shown in Fig. 5b. The curves closely resemble those obtained with dilutions and multiples of the standard medium. A slight discrepancy occurred in the medium with 3/10-nitrogen where

the R was slightly higher, though not significantly so, than that in the standard medium.

This experiment, with its wide range of nitrate concentrations, illustrated very clearly the great differences in the pigmentation of *Monodus* which may occur under different conditions. Cultures with $1/10$ -nitrogen were distinctly yellow-green even during exponential growth, and on the 26th day when the experiment was discontinued they had become yellow. Cultures with $3/10$ -N retained a yellow-green colour throughout; cultures in the standard medium were a much truer green, while those

with $3 \times N$ were very dark green and indistinguishable to the naked eye from *Chlorella* cultures.

9. Nitrogen and phosphorus requirements. The normal-strength standard medium was used to determine more accurately the nitrogen and phosphorus requirements of *Monodus* in the following way. In a series of duplicate cultures, the potassium phosphate content of the medium was varied over an approximately logarithmic range of $1/1000$ -P, $3/1000$ -P and $1/100$ -P, on the assumption that at very low concentrations of phosphorus in an otherwise optimal medium, the number of cells produced in excess of that in the phosphorus-free controls would be

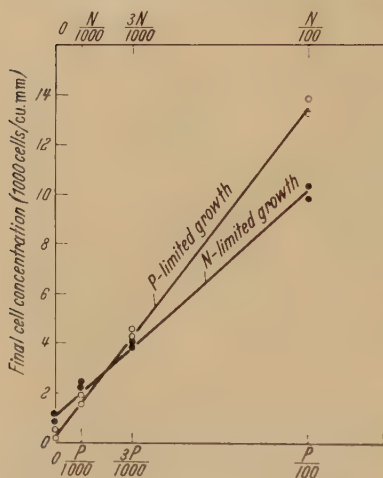


Fig. 6. Growth, in terms of cell concentration, in the standard medium with limiting nitrate and with limiting phosphate

roughly proportional to the quantity of phosphate added, and would allow the requirement per cell to be calculated. In the low-phosphate media the potassium content was restored to the value in the standard medium by appropriate additions of potassium chloride. Similarly a series of low-nitrate media was prepared, containing $1/1000$ -N, $3/1000$ -N and $1/100$ -N. The sodium content of these media was made up with sodium chloride. The inoculum for this experiment was suspended in a solution without nitrogen or phosphorus. Frequent cell counts were made until the 19th day. After a certain point the growth rates decreased suddenly, and the cell counts at these points were plotted.

The results (Fig. 6) demonstrate in each case a close linear relationship between the amount of nutrient added and the production of further cells. From the best-fitting line through the points in the Figure, a phosphorus requirement of $0.00089 \mu\mu\text{g.}-\text{atom P/cell}$ was computed. A similar calculation for the response to nitrate gave a nitrogen requirement of

0.0228 $\mu\text{g.}$ -atom N/cell. The N:P ratio required by the organism is thus 25.6:1.

An interesting feature was that growth was complete in all media with limiting nitrate by the 13th day, whereas a slow increase in cell number continued in some of the low-phosphorus media until the 19th day. Exponential growth occurred for a brief period in all of these media. It was of too short a duration to permit accurate determination of R, but that in the highest concentration of nitrate used in this experiment appeared not to differ significantly from that in the controls of standard medium, whereas that in the highest phosphate concentration was somewhat lower.

The N:P ratio calculated for the organism differed from the value of 17.4:1 employed in the standard medium, but nevertheless the original composition (see Table 3) was retained since only 70% of the maximum theoretical number of non-deficient cells at this nitrate level was produced in the medium.

Table 3. *Composition of the standard mineral medium*

NaNO ₃	0.02 m	B (as H ₃ BO ₃)	0.2 p.p.m.
K ₂ HPO ₄	0.00115 m	Mn (as MnCl ₂ · 4H ₂ O)	0.2 p.p.m.
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.0008 m	Mo (as MoO ₃)	0.2 p.p.m.
CaCl ₂	0.00063 m	Co (as CoCl ₂ · 6H ₂ O)	0.02 p.p.m.
Ferric citrate	0.00002 m	Cu (as CuSO ₄ · 5H ₂ O)	0.02 p.p.m.
(as ferric citrate-citric acid mixture)		Zn (as ZnSO ₄ · 7H ₂ O)	0.02 p.p.m.

Very satisfactory growth was obtained with this medium in the continuous culture apparatus. Exponential growth could be maintained with cell concentrations of the order of 200,000 per mm³.

10. Other nitrogen sources in the standard medium. Most media described in the literature contain potassium nitrate or an ammonium salt as the nitrogen source. In view of the low potassium requirement of *M. subterraneus*, sodium nitrate may be employed in place of the more costly potassium salt. This might be an important consideration in mass culture. The rise in p_H during growth in nitrate media appears not to be injurious to the organism. Ammonium uptake is accompanied by a fall in p_H, frequently resulting in inhibition of growth. The uptake of urea does not result in a p_H change, and the advantages of using this substance have been pointed out by e.g. BJÖRKMAN et al. (1955) who reported better growth of mass cultures of *Chlorella pyrenoidosa* in urea than in nitrate. An experiment was therefore carried out with various nitrogen sources in the standard medium in place of sodium nitrate. Each medium had the same nitrogen content as the standard medium.

With potassium nitrate as the nitrogen source, the R during exponential growth was significantly lower than with sodium nitrate (0.242 ± 0.0073 ,

compared with 0.254 ± 0.0044). The mean final cell concentration, 515,000 per mm^3 , was also significantly lower than in the standard medium (610,000). This agrees with the findings with the all-potassium variant of the basal medium E (§5). The reason for poorer growth in high potassium concentration is not clear.

Ammonium chloride gave very poor growth. In one pair of cultures the p_H was adjusted daily to neutrality with sodium hydroxide, and in these the relative growth rate was about 0.15 and the final cell concentration 52,600 per mm^3 . In another pair of cultures no p_H adjustment was made: here the p_H fell rapidly to about 3.5 after which little growth took place. The maximum cell concentration reached here was 3400 per mm^3 .

Urea was also tested as a nitrogen source. R in this case was 0.241 ± 0.0026 , which again was significantly lower than in sodium nitrate, although the mean final cell count in urea medium was slightly higher. No adjustment of cation balance was made in this medium, which may account for the lower value found for R . Urea has the disadvantage that it may favour the growth of bacterial contaminants and its use in a medium for the mass culture of *Monodus* in place of sodium nitrate would incur no advantage.

11. Effect of higher light intensity and carbon dioxide concentration. Although the final cell concentration and the duration of the logarithmic phase of growth were both considerably greater in the standard medium than in Chu no.10, comparatively little increase had been effected in the relative growth rate. This was about 0.23 in Chu no.10 under normal experimental conditions, and up to 0.255 in the standard medium, the higher figure representing a generation time of 28.3 hrs. Under certain conditions, however (§1), values nearer to the latter figure could be achieved in Chu no. 10.

It was borne in mind that in the more concentrated media the factor limiting growth might be the light intensity or the rate of provision of carbon dioxide. An attempt was therefore made to improve growth in the standard medium by increasing the incident light intensity to 6500 m.-candles. R in this experiment was 0.259, a slightly higher value than those obtained at 3600 m.-candles, though a statistical comparison was not possible owing to the absence of controls at the lower intensity in this experiment. Exponential growth continued for a further day or more in high light, and was followed by a period of 7 days during which the cell count increased at a constant rate, suggesting that growth was now limited by the rate of supply of carbon dioxide. This is confirmed by the fact that in the continuous culture apparatus, when air + 5% carbon dioxide was supplied at a high rate, exponential growth took place at these high cell concentrations. The final cell concentration in high light was no higher than values obtained at the usual light intensity.

Thus it does not seem possible materially to increase the relative growth rate of *Monodus* or the final cell count by employing higher light intensities or carbon dioxide concentrations, or by increasing the mineral concentrations above their values in the standard medium. Improvement in physical conditions causes prolongation of exponential growth until about one-third of the final cell count is reached.

Discussion

Compared with *Chlorella* spp. and other *Chlorococcales* commonly grown in laboratory culture, *Monodus subterraneus* is less tolerant to variations in composition of the inorganic medium and appears to grow well only at low concentrations of calcium or high monovalent:divalent cation ratios. It resembles *Chlorella* in having a low actual requirement for calcium, and apparently belongs to that group of algae designated by PEARSALL (1922) as requiring a high monovalent:divalent cation ratio. The cation relations of algae may, however, be very complex as shown by PROVASOLI et al. (1954), who found for two freshwater algae an interaction between total salt concentration, monovalent:divalent cation ratio and calcium:magnesium ratio. Investigation of such interactions has not been attempted with *M. subterraneus*, and it is possible that better growth may be obtained at the higher calcium concentrations by increasing the magnesium content (VOLLENWEIDER 1950), or the monovalent cation content.

In a purely inorganic medium of suitable composition, however, *Monodus* shows fairly rapid growth and gives high final yields of cells. Although the maximum value found by us for its relative growth constant is only about one-half of values determined at comparable temperature for many other unicellular algae (see MYERS 1951, and EDDY 1956), the final cell concentrations are of the order of ten times those obtained with a number of green algae by EDDY (1956) and are about as high as those obtained with *Chlorella pyrenoidosa* by MYERS (1944) using a much more concentrated medium in every respect but nitrate concentration. In two of our experiments a lack of correlation was noticed between dry weight and cell number. This demonstrates the unreliability of dry weight estimations, especially single ones at arbitrary times after exponential growth has ceased, as criteria of growth, if growth is taken to imply the continuous repetition of the full life-cycle of the cells and not merely the indefinite enlargement of the cells without division.

The nitrogen:phosphorus ratio of 25.6:1 found for *Monodus* is in fairly close agreement with values found for other algae, such as the mean value of 20 (9, by weight):1 cited by HARVEY (1940) for several species of marine diatoms. The figures given in the present paper for the nitrogen and phosphorus requirements are not the minimal requirements per cell.

It is known that certain algae, e.g. *Nitzschia closterium*, will continue to divide after the phosphate in a medium is exhausted, giving cells which contain under 20% of the "normal" phosphorus content, while *Chlorella pyrenoidosa* will grow in a non-nutrient medium to produce cells containing one-third of the normal phosphorus content and one-half of the normal nitrogen content (KETCHUM 1939). Our figures, then, may not represent the nitrogen and phosphorus contents of cells growing under conditions of deficiency of these nutrients.

As a result of this exploratory work, we are in a position to use *Monodus* as an experimental organism for the detailed investigation of the metabolism of the *Xanthophyceae*.

Summary

1. A quantitative study has been made of the growth and mineral nutrition of the xanthophycean alga *Monodus subterraneus* Petersen under various physical conditions. Optimal conditions for growth have been defined.

2. Growth was found to occur in Chu's medium no. 10 over a pH range of 3.0—9.5, the optimum lying between 6.0 and 7.7.

3. Ferric citrate was found to be a satisfactory source of iron over the full range of pH tested.

4. Growth was not improved by increasing the calcium nitrate concentration in Chu no. 10, but was improved by adding sodium nitrate. Growth in various mixtures of the two nitrates showed an optimal range at calcium nitrate concentrations of less than 1.7 millimolar, or monovalent:divalent cation ratios greater than about 10:1.

5. The potassium requirement of *M. subterraneus* was found to be low, and not to exceed $0.0012 \mu\text{g.}-\text{atom K/cell}$. Growth was somewhat poorer in a concentrated medium in which all the sodium was replaced by potassium.

6. The organism has a low tolerance to phosphate, no growth taking place in concentrations higher than 0.005 m.

7. On the basis of these results a concentrated medium was devised for *Monodus*.

8. Growth was studied at various dilutions and concentrations of this medium. The solution at normal strength (a total salt concentration of 2.072 g./l.) gave the most satisfactory growth, relative growth rates of about $0.254 \log_{10}/\text{day}$ units and final cell concentrations of 6×10^5 per mm^3 being obtained. It was taken as a standard medium for further experimentation.

9. Employing modifications of the standard medium, a phosphorus requirement of $0.00089 \mu\text{g.}-\text{atom P/cell}$ was found, and a nitrogen requirement of $0.0228 \mu\text{g.}-\text{atom N/cell}$.

10. Ammonium chloride gave much poorer growth than sodium nitrate in the standard medium, even if the p_H was adjusted daily to neutrality. Potassium nitrate and urea both gave slightly lower growth rates than sodium nitrate.

11. Little increase in the relative growth rate or final cell concentration could be effected by employing higher light intensity or aeration with 5% carbon dioxide in air: the duration of exponential growth was merely prolonged.

Acknowledgements. We are grateful to the Agricultural Research Council and the Nuffield Foundation for grants which made possible the investigations described in this paper; and to Mr. W. E. E. SMITH for constructing the continuous culture apparatus.

References

- BELCHER, J. H., and G. E. FOGG: *New Phytologist* **54**, 81 (1955). — BJÖRKMAN, L., M. BJÖRKMAN, A. BRESKY, L. ENEBO and J. RENNERFELT: *Acta polyt., Stockh., Chemistry incl. metallurgy series* **4**, 1 (1955).
- CHU, S. P.: *J. Ecol.* **30**, 284 (1942). — COLLYER, D. M., and G. E. FOGG: *J. of Exper. Bot.* **6**, 256 (1955).
- EDDY, B. P.: *J. of Exper. Bot.* **7**, 372 (1956).
- FOGG, G. E.: *Ann. of Bot.* **13**, 241 (1949). — FOWDEN, L.: *Ann. of Bot.* **18**, 257 (1954). — FRITSCH, F. E.: *The structure and reproduction of the algae*, vol. 1, Cambridge University Press 1935.
- GREENWOOD, A. D., I. MANTON and B. CLARKE: *J. of Exper. Bot.* **8**, 71 (1957).
- HARVEY, H. W.: *J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd.* **24**, 115 (1940).
- JAMIKORN, M.: Ph. D. thesis. Liverpool 1954; quoted by GOODWIN, T. W.: in *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, vol. 5, in the press.
- KETCHUM, B. H.: *J. Cellul. a. Comp. Physiol.* **13**, 373 (1939).
- LEWIN, J. C.: *J. Gen. Microbiol.* **9**, 305 (1953).
- MAST, S. O., and D. M. PACE: *J. Cellul. a. Comp. Physiol.* **14**, 261 (1939). — MILLER, J. D. A., and G. E. FOGG: in preparation. — MYERS, J.: *Plant Physiol.* **19**, 579 (1944). — *Ann. Rev. Microbiol.* **5**, 157 (1951). — MYERS, J., and L. B. CLARK: *J. Gen. Physiol.* **28**, 103 (1944).
- NICOLAI, E., and R. D. PRESTON: *Proc. Roy. Soc., B* **140**, 244 (1952). — NORRIS, L., R. E. NORRIS and M. CALVIN: *J. of Exper. Bot.* **6**, 64 (1955).
- PEARSALL, W. H.: *J. Ecol.* **9**, 241 (1922). — PEARSALE, W. H., and L. LOOSE: *Proc. Roy. Soc., B* **121**, 451 (1937). — PETERSEN, J. B.: *Arch. Protistenk.* **76**, 395 (1932). — PROVASOLI, L., J. J. A. McLAUGHLIN and I. J. PINTNER: *Trans. N. Y. Acad. Sci., Series 2*, **16**, 412 (1954).
- RODHE, W.: *Symbolae bot. Upsalienses* **10**, (1), 1 (1948).
- STRAIN, H. H.: *Manual of phycology*. ED. SMITH, G. M.: *Chronica Botanica Co.*, Waltham, Mass. 1951, p. 243.
- VOLLENWEIDER, R. A.: *Schweiz. Z. Hydrol.* **12**, 1 (1950).
- WORK, E., and D. L. DEWEY: *J. Gen. Microbiol.* **9**, 394 (1953).

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen)

Studien zum L-Cyclus der Bakterien

(Nach Untersuchungen an *Proteus vulgaris* unter dem Einfluß von Penicillin *)

Von

HANS BENDER

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. April 1957)

Einleitung

Ausgehend von Untersuchungen KLIENEBERGERS (1935) an *Streptobacillus moniliformis* mehrten sich in den letzten 15 Jahren Angaben über einen spontan oder durch chemische bzw. physikalische Agentien auftretenden Formwandel bei verschiedenen Bakterien, der nach KLIENEBERGER allgemein als L-Cyclus bezeichnet wird.

Literatur findet sich bei: DIENES 1939a, 1939b, 1942, 1946, 1947a, 1947b, 1949a, 1949b, 1953a, 1953b, DIENES u. SMITH 1944, DIENES u. WEINBERGER 1951, DIENES u. ZAMECNIK 1952, DIENES, WEINBERGER u. MADOFF 1950, KANDLER u. KANDLER 1954a, 1954b, 1955, KANDLER, ZEHENDER u. MÜLLER 1956a, 1956b, 1956c, KLIENEBERGER 1942, LIEBERMEISTER u. KELLENBERGER 1956, NELLES 1955, PIERCE 1942, STEMPEN u. HUTCHINSON 1951, TULASNE 1949a, 1949b, 1951, TULASNE u. BRINGMANN 1952. Zusammenfassungen: DIENES u. WEINBERGER 1951, KANDLER u. KANDLER 1954a, PULVERTAFT 1953, SCHELLENBERG 1954b, TULASNE 1951.

Einzelne Wuchsformen dieses Cyclus sind zur Genüge beschrieben. So ist die Bildung von Kugelformen — large bodies — und deren Rückwandlung in die Ausgangsform auf Normalsubstrat durch mikrophotographische Aufnahmeserien belegt (DIENES 1947b, DIENES u. SMITH 1944, VON PRITZWITZ UND GAFFRON 1953, STEMPEN u. HUTCHINSON 1951). Es ist bemerkenswert, daß sich diese large bodies durch eine beachtliche Zunahme der Kernsubstanz — DNS — auszeichnen (RIPPEL-BALDES u. BUSCH 1954, RIPPEL-BALDES, BUSCH u. RADLER 1956). Die eigentlichen L-Formen (L-Einheiten, L-Granula, globuläre Formen nach KELLENBERGER u. LIEBERMEISTER 1956) werden von den meisten Autoren als kugelige Gebilde in der Größenordnung von $0,17$ — $1,5 \mu$ beschrieben (DIENES 1953a, HÖPKEN u. BARTMANN 1955, KLIENEBERGER-NOBEL 1951a, RUBIO-HUERTOS, KÜSTER u. FLAIG 1955, TULASNE 1949a, TULASNE u. BRINGMANN 1952). Sie liegen an der unteren Grenze im filtrierbaren Bereich, jedoch sind positive Angaben nur bei stabilen L-Phasengemacht worden (KELLENBERGER u. LIEBERMEISTER 1956, KLIENEBERGER-NOBEL 1951).

* Auszug aus dem ersten Teil einer Dissertation „Studien zum Gestaltwandel der Bakterien. (Nach Untersuchungen an *Proteus vulgaris* und einem gram-negativen unbeweglichen Stäbchen)“ der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen 1956.

Wie die large bodies bestehen diese L-Einheiten zu einem großen Teil aus DNS-Substanz. Auf eine Ähnlichkeit mit den Organismen der PPLO-Gruppe wie auch mit großen Viren wurde verschiedentlich hingewiesen (DIENES 1953a, 1953b, EDWARD 1954, KANDLER u. KANDLER 1954a, LIEBERMEISTER 1953a, 1953b, RUSKA u. POPPE 1947).

Die Angaben über die Vermehrungsweise der L-Formen sind nicht einheitlich. Neben einer Zweiteilung (TULASNE u. BRINGMANN 1952, WEINBERGER, MADOFF u. DIENES 1950) wird eine uni- bis multipolare Knospung angenommen (BRINGMANN 1954a, HÖPKEN u. BARTMANN 1955, KANDLER u. KANDLER 1954a, 1954b, NELLES 1955, WEINBERGER, MADOFF u. DIENES 1950). Ein Anschwellen der L-Granula zu large bodies, in deren Innern erneut L-Einheiten entstehen, oder das Ausfließen einer Kugelform und extracelluläre Bildung der L-Organismen wurde beobachtet (LIEBERMEISTER 1953a, STEMPEN u. HUTCHINSON 1951, TULASNE 1951). Es werden verschiedene Typen sowohl der Individuen (z. B. L_1 — L_6) wie der Kolonien (3A-Typ bzw. 3B-Typ) unterschieden (DIENES u. WEINBERGER 1951, siehe auch KANDLER u. KANDLER 1956). Die nicht stabilen L-Phasen bilden auf Normalsubstrat die Ausgangsbakterien zurück (BRINGMANN 1954a, DIENES u. WEINBERGER 1951, MEDILL u. HUTCHINSON 1954, TULASNE 1949a).

Morphologie, Wachstum und Vermehrungsweise der L-Organismen werden durch die vorliegenden Arbeiten nicht befriedigend geklärt, sondern lediglich in ihrer Formenfülle aufgezeigt. DIENES (1953a) kommt auf Grund der morphologischen Mannigfaltigkeit zu dem Schluß, daß die L-Formen keine Einheit bilden. Sie werden vielmehr zusammengesetzt aus einer Anzahl von Varianten, die beträchtlich voneinander abweichen können. Während in einigen Arbeiten angenommen wird, daß die large bodies regelmäßige Entwicklungsstadien der L-Phase sind (LIEBERMEISTER 1953a, TULASNE 1951), treten diese nach anderen Angaben nicht unbedingt auf (NELLES 1955), sie werden auch für degenerativ angesehen (FREUNDT 1950, 1952, siehe auch RADLER u. RIPPEL-BALDES 1956).

Zweck der vorliegenden Arbeit war es, durch eingehende Untersuchungen einen Einblick in die wahren Entwicklungs- und Wachstumsvorgänge der L-Phase von *Proteus vulgaris* zu erhalten.

Methodik

Folgende Stämme von *Proteus vulgaris* wurden untersucht: 1. isoliert aus Fäces; 2. isoliert aus Urin; 3. stabile L-Phase des Stammes „Dienes 521“.

Substrate: a) Normalsubstrat: 2%iger Fleischwasser-Pepton-Agar, pH 7. b) Versuchssubstrat: 1,5%iger Fleischwasser-Pepton-Agar, pH 7, + 10% Pferdeserum + 1000 IE/ml Penicillin „Hoechst“, gelöst in Phosphatpuffer pH 6,8.

Beimpft wurde bei den Stämmen 1 und 2 mit 0,5—1 ml der Suspension einer 24 Std alten Normalkultur in Fleischwasser-Pepton-Bouillon, Dichte 10^5 Zellen/ml. Zur Weiterimpfung der L-Phase wurde ein kleines Stück Agar mit einer L-Kolonie auf das neue Substrat übertragen und ausgestrichen. Die Bebrütung erfolgte in allen Fällen bei 30° C.

Beobachtet wurden die Versuchsplatten alle 12 Std. Dazu wurde in den ersten 72 Std der Bebrütung mit einer Platinöse ein Stück Agar, das Mikrokolonien und

¹ Herrn Doz. Dr. O. KANDLER danke ich herzlich für die Überlassung dieses Stammes.

später eine makroskopisch sichtbare L-Kolonie enthielt, abgenommen, auf einen Objektträger gebracht und vorsichtig mit einem Deckglas bedeckt. (An den Ecken des Deckglases angebrachte Paraffinfüßchen verhinderten ein Zerquetschen des Agarstückes.) Alle Umwandlungen wurden durch Direktbeobachtung verfolgt und in mikrophotographischen Aufnahmeserien festgehalten.

Die Agardeckglaspräparate wurden im Prinzip nach der von KNÖLL (1944) angegebenen Methode mit geringen Abänderungen hergestellt: Unter sterilen Bedingungen wurde ein kleines Stück des erkalteten Versuchsagars (Durchmesser bis 6 mm, Höhe 1—2 mm) auf einen sterilen Objektträger gebracht und mit wenigen Zellen der zu untersuchenden Bakterien beimpft. Bei der Untersuchung des Wachstums der L-Phase wurde mit einer makroskopisch gerade noch sichtbaren L-Kolonie beimpft. Auf das Agarstück wurde vorsichtig ein steriles Deckglas gelegt und mit flüssigem Paraffin sorgfältig verschlossen. Die Präparate wurden durch einen selbstgebauten Heiztisch konstant bei 30° C bebrütet.

Neben den üblichen Färbemethoden wurden an Agarklatschpräparaten die FEULGEN-Kernfärbung und die SÄURE-GIEMSA-Färbung durchgeführt, wobei im allgemeinen die von KLIENEGER u. SMILES (1942) angegebene Methode der Agarfixation als Vorbild diente. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde allerdings größerer Wert gelegt auf eine Lebendbeobachtung, da selbst die vorsichtig durchgeführten Fixierungen in 2%iger Chromsäure oder Osmiumdämpfen (KANDLER u. KANDLER 1954a) zur Artefaktbildung neigten.

Optische Ausrüstung. Die mikroskopischen Untersuchungen wurden durchgeführt am Ortholux-Forschungsmikroskop von Leitz mit dem Heineschen Kondensor zur Erzeugung des Phasenkontrastes. Die Mikroaufnahmen machten wir mit der Exacta Varex in der Kombination für Mikrophotographie (Mikroskopaufsatz und Objektivlupeneinsatz) auf Agfa Agepe-Dokumentenfilm und KBI4 Adox.

Ergebnisse

Überblicksmäßig läßt sich der gesamte L-Cyclus in drei Abschnitte einteilen: 1. Umwandlung der Ausgangsbakterien in large bodies. 1a. Rückwandlung derselben auf Normalsubstrat. — 2. Weiterentwicklung der großen Körper zu L-Formen und deren Subkultivierung — Eigentliche L-Phase. — 3. Rückwandlung der L-Organismen auf Normalmedien, sofern es sich nicht um stabile L-Phasen handelt.

1. Die Umwandlung der Stämme 1 und 2 von *Proteus vulgaris* auf Penicillin-haltigem Substrat wurde beobachtet und in mikrophotographischen Serienaufnahmen festgehalten. Sie steht im Einklang mit den Angaben der Literatur und braucht nicht eingehender erörtert zu werden. Von 100 eingepfunden lebensfähigen Zellen entwickeln sich 60—65 zu Kugelformen. Dieser Prozentsatz bleibt auch mit zunehmendem Alter der Ausgangskultur (Normalkultur) gleich. Von den gebildeten large bodies sind nur 10—15% lebensfähig; d. h. sie zeigen auf Normalmedien eine Rückwandlung in die Ausgangsform oder entwickeln sich auf der Penicillin-Platte weiter zu L-Einheiten¹.

2. Stamm 1 und 2 bilden auf dem Versuchssubstrat nach 3—5 Tagen kleinste L-Kolonien von 0,2—1 mm Durchmesser. Bei schwacher

¹ Ausführliche Angaben über diese Untersuchungen finden sich in der Dissertation Tübingen 1956, S. 19—28.

Vergrößerung zeigen die Oberflächenkolonien einen zwei-zonigen Aufbau (siehe auch STEMPEN u. HUTCHINSON 1951). Um ein dichteres Zentrum legt sich eine durchsichtige Randzone. Im Gegensatz dazu zeigt Stamm 3 (*Proteus vulgaris* „Dienes 52“) amorphe bräunliche Kolonien (KANDLER u. KANDLER 1954a). Die Tiefenkolonien sind bei allen drei Stämmen amorph bis flockig.

Die mikroskopische Beobachtung zeigt extrem pleomorphe large bodies, die in eine cytoplasmatische, wohl durch Lyse von Kugelformen entstandene Grundmasse eingelagert sind. Die großen Körper brechen das Licht verschieden stark. Sie erscheinen im Phasenkontrast teilweise dunkel, teilweise blaß und blasenförmig, wohl Zellen, die in Auflösung begriffen sind. (Nach SCHELLENBERG, 1954b, „verdämmernde Formen“.) Die hyalinen Blasen lassen in manchen Fällen körnige Inhaltsstoffe erkennen. Neben solchen Granula ließ nichts auf eine granuläre L-Phase schließen.

Zunächst wurde besonderer Wert gelegt auf die Beobachtung der Granula in den hyalinen large bodies. Sofern es sich nicht um lebensfähige plasmatische Reste (siehe S. 24) eines geplatzten large body handelte, zeigten typische Körnchen in keinem Fall eine Weiterentwicklung. Ebenso verliefen Filtrationsversuche an den L-Phasen der drei untersuchten Stämme durch Membranfilter verschiedener Porenweite (300—600 m μ) negativ. Daraufhin kamen Formen zur Beobachtung, die in der Literatur als large bodies bezeichnet werden: die in allen Wachstumsphasen einer Penicillin-Kultur vorliegenden mehr oder weniger kugeligen Gebilde. Es darf bei der weiteren Beschreibung für jede vermehrungsfähige Zelle innerhalb der L-Phase der Begriff „L-Form“ oder „L-Einheit“ verwendet werden. (Siehe auch LIEBERMEISTER 1953a.)

Entwicklung des Stammes 3 (*Proteus vulgaris* „Dienes 52“)

Substrat und Versuchsbedingungen: 1,5%iger Fleischwasser-Pepton-Agar, 10% Pferdeserum, 1000 IE/ml Penicillin. Beimpft mit einer 4 Tage alten L-Kolonie. Bebrütung bei 30° C.

Im Agardeckglaspräparat liegen zu Beginn der Beobachtung neben Zelldetritus und hyalinen Kugeln im Phasenkontrast dunkel erscheinende L-Formen aller Größen vor. Von diesen lysiert während der Lag-Phase ein großer Teil. Die lebensfähigen Formen zeigen nach unseren Beobachtungen eine Weiterentwicklung in drei Modifikationen:

a) Bildung von „Vermehrungszentren“. In den amöboid-unregelmäßigen bis kugeligen L-Formen bilden sich nach einer Inkubationszeit dunklere Zentren, die von KANDLER u. KANDLER (1954a) als Vermehrungszentren bezeichnet werden. Diese Zentren vergrößern und teilen sich. Neben einer Zweiteilung (äqual oder inäqual) können durch Ausfließen der Vermehrungszentren und weitere Teilung Bilder einer

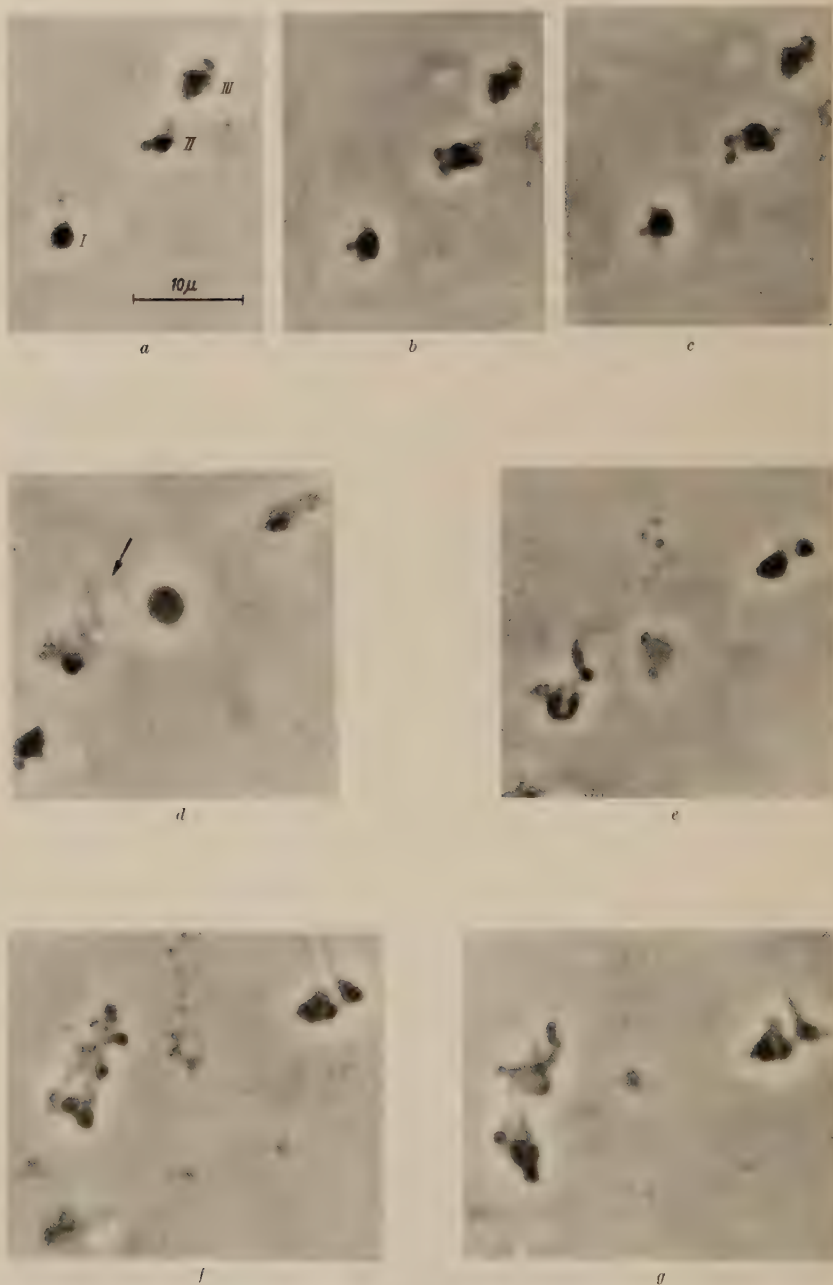


Abb. 1. L-Phase von *Proteus vulgaris* Stamm 3. Wachstum durch flächiges Ausfließen (Pfeil) des Plasmas. a 11.00 Uhr; b 12.00; c 13.00; d 13.45; e 15.00; f 17.00; g 18.00

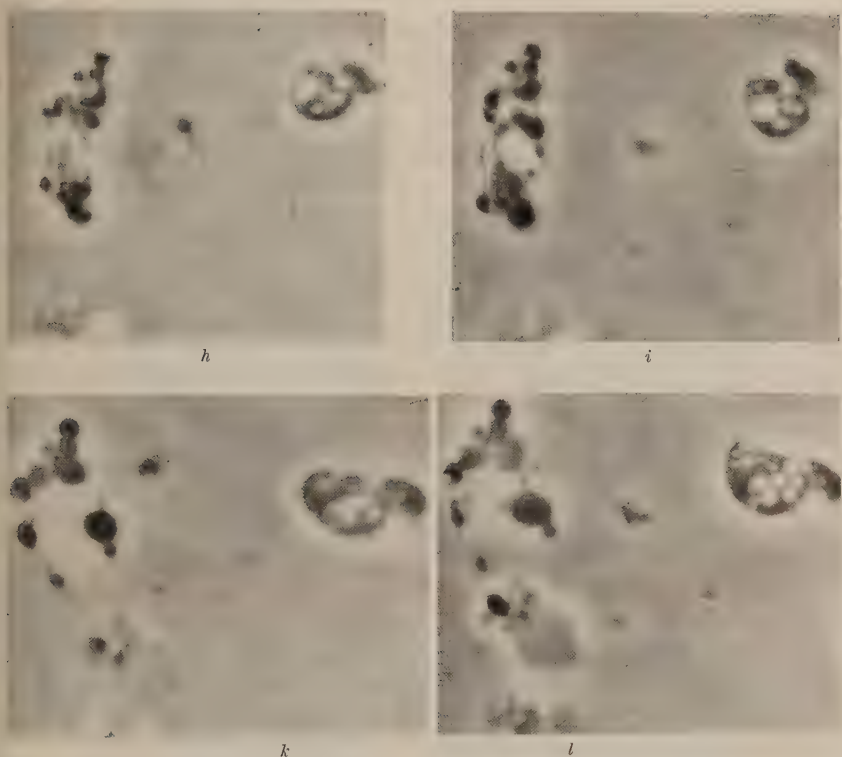


Abb. 1 (Fortsetzung), h 20.00; i 23.00; k 8.00; l 12.00

uni-multipolaren Knospung entstehen, wie sie von den zitierten Autoren auch beschrieben wurden. (Größe der Zentren zwischen $0,5$ und 2μ .)

b) Bildung pseudopodienartiger, fädiger Auswüchse. Nach der Inkubationszeit verlängern sich die ganzen L-Einheiten. An den Enden der so verlängerten Individuen bilden sich feinste pseudopodienartige, fädige Auswüchse. Diese Bildungen sind wegen ihrer Feinheit oft nicht photographisch wiederzugeben. Die Pseudopodien segmentieren sich und kugeln sich ab in neue, kleine L-Einheiten, von denen eine weitere Entwicklung ausgehen kann.

c) Weiterentwicklung durch flächiges Ausfließen des Plasmas (Abb. 1). Die Beobachtung und Deutung des Wachstums einer L-Kolonie ist dadurch erschwert, daß das Wachstum nicht flächig sondern in die Tiefe des Agars erfolgt (HÖPKEN u. BARTMANN 1955). Nach zahlreichen vergeblichen Versuchen gelang es doch, eine Entwicklung in einer Ebene zu beobachten. Die hier zu beschreibenden Vorgänge tragen wesentlich zum Verständnis der Morphologie einer L-Kolonie bei. Beobachtet wurden 3 L-Einheiten (I, II und III), durchschnittliche Größe 2μ .

I. Diese Zelle liegt vor als dunkel erscheinender kugelliger L-Organismus. Nach der Lag-Phase von einer Stunde bilden sich drei knospen-pseudopodienartige Auswüchse (Abb. 1, a und b). Diese Bildungen zerfließen in den Agar (Abb. 1, c und d). Beinahe spontan entstehen von dem ausgeflossenen Protoplasma zunächst drei, von der ursprünglichen L-Einheit zwei Vermehrungszentren (Abb. 1, e). Das geschieht so, daß sich das Plasma an einigen Stellen verdichtet, diese Verdichtung ist direkt unter dem Mikroskop zu beobachten. (Allerdings sind in diesem Fall die Konturen so zart, daß sie nicht in allen Einzelheiten von der photographischen Platte erfaßt werden.) Durch fortgesetzte Verdichtung und plasmatische Substanzzunahme erhöht sich die Zahl der Vermehrungszentren auf 18. Diese zeigen weiteres Wachstum und führen zur Bildung von zunächst noch unregelmäßigen L-Einheiten (Abb. 1, f—i). Bei Fortdauer der Bebrütung nehmen die L-Formen unter Volumenzunahme immer mehr Kugelgestalt an. Ein Teil von ihnen lysiert, die übrig bleibenden zeigen im Deckglaspräparat keine Veränderung mehr (Abb. 1, k und l). Von diesen nicht zugrunde gegangenen L-Einheiten muß auf neuem Substrat die Weiterentwicklung ausgehen.

II. Nach einer Inkubationszeit von 2 Std Bildung von 2, dann 4 knospenartigen Gebilden (Abb. 1, a—c). Die L-Form verdämmert bei weiterer Bebrütung (Abb. 1, d—e) und lysiert schließlich (Abb. 1, f). Von den abgeschnürten knospenartigen Vermehrungszentren bleibt eines entwicklungsfähig. Die Entwicklung liegt nicht in der photographischen Beobachtungsebene und bleibt deshalb unklar.

III. Liegt vor als form-unregelmäßiges Gebilde. Teilung nach einer Beobachtungszeit von 3 Std in zwei ungleich große Teile (Abb. 1, e). Bildung feinsten fädiger Auswüchse (Abb. 1, f). Der Zellkörper verdichtet sich zunächst zu Vermehrungszentren (Abb. 1, g); nach weiterer Bebrütung runden sich die L-Einheiten ab (Abb. 1, g—i), vereinigen sich wieder und vacuolisieren unter Größenzunahme. Der große Körper wie auch die fädigen Auswüchse zeigen keine weitere Entwicklung (Abb. 1, k—l).

Entwicklung der L-Phase von *Proteus vulgaris* Stamm 1 und 2 (Abb. 2)

Da sich diese Stämme gleich verhielten, darf die Beschreibung auf den ersten Stamm beschränkt werden.

Substrat und Versuchsbedingungen: 1,5% iger Fleischwasser-Pepton-Agar, 10% Pferdeserum, 1000 IE Penicillin/ml. Beimpft mit einer 4 Tage alten L-Kolonie, bebrütet bei 30° C.

Es sind im Beobachtungsausschnitt 4 L-Formen (I—IV) in der Größe von 1,5—3,5 μ getroffen. Zwei von ihnen liegen in den Resten einer lysierten L-Einheit neben kleineren Zentren und Granula. Es kann immer wieder festgestellt werden, daß bei der Lyse einer L-Form ein bis

mehrere Zentren übrig bleiben, die sich unter günstigen Bedingungen weiter entwickeln (siehe auch SCHELLENBERG 1954a). Nach einer Inkubationszeit von 2 Std beginnen die L-Einheiten als kompakte Plasmamassen zu wachsen. Dabei ist zu bemerken, daß die pseudopodienartigen Auswüchse im Vergleich zu Stamm 3 nur grob ausgebildet

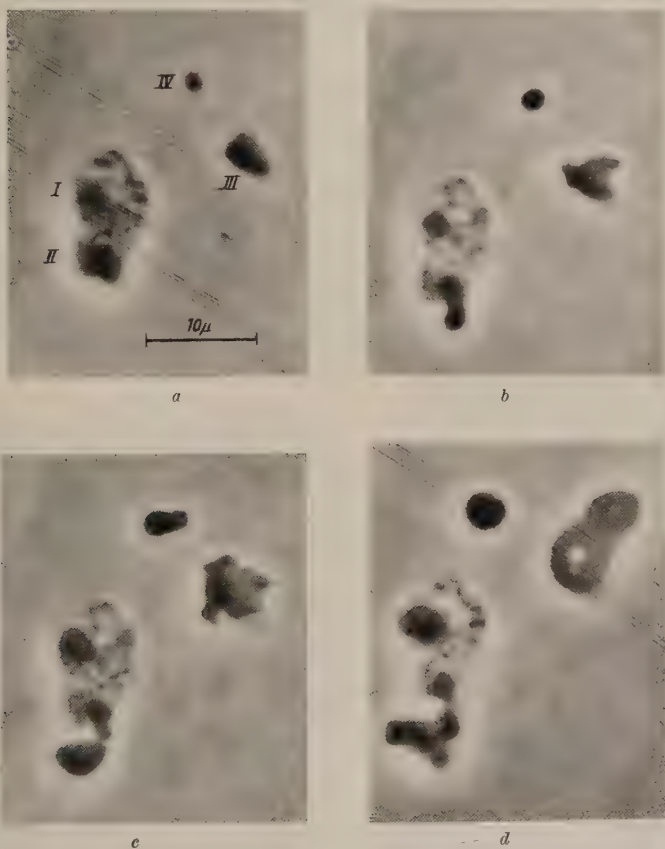


Abb. 2. L-Phase von *Proteus vulgaris* Stamm 1. a 10.00 Uhr; b 11.30; c 13.00; d 14.00

werden, ebenso scheinen Vermehrungszentren in typischer Form zu fehlen (Abb. 2, b—c). Die Plasmamassen teilen sich unregelmäßig und verschmelzen teilweise wieder (Abb. 2, c—g). Überhaupt zeigen diese Gebilde dauernd reversible amöboide Formveränderungen: Die Auswüchse können spontan eingezogen werden, so daß nahezu glatte, kugelige Organismen entstehen (Abb. 2, b—d, L-Einheit III). Nach weiterer Inkubation bilden sich erneut amöboide Formen aus, die sich nach Größenzunahme teilen (Abb. 2, d—l, Nr. III). Ebenso treten

reversible Vacuolisierungen auf (Abb. 2, c—e, Nr. III). Nach einer bestimmten Bebrütungsdauer werden die Abkugelungsvorgänge irreversibel. Die entstandenen kugeligen Gebilde lysieren zum Teil spontan (Abb. 2, g—i, Nr. I) oder verdämmern langsam (Abb. 2, f—l, Nr. II).

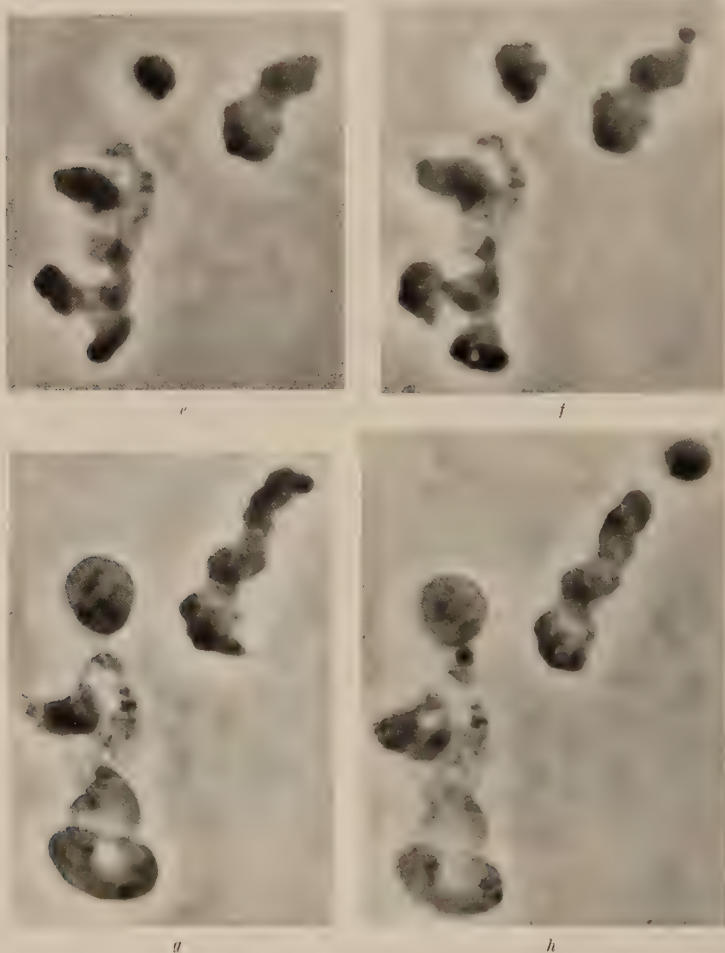
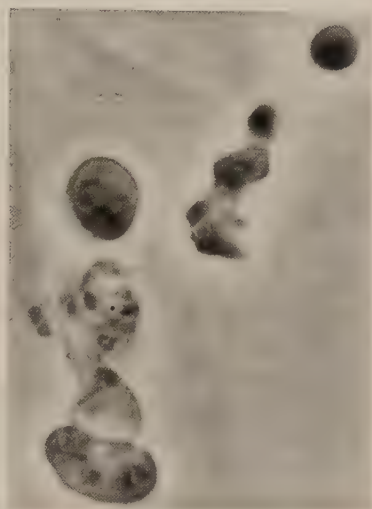


Abb. 2 (Fortsetzung). e 15.00; f 16.00; g 17.00; h 18.00

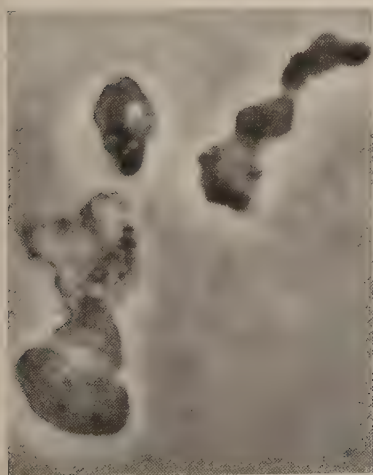
Vor dem Verblässen einer L-Einheit kann eine kleinere Plasmaportion abgeschnürt werden, die als dunkel erscheinender L-Organismus erhalten bleibt (Abb. 2, i—l, Nr. IV). Auch die kleineren dunkel erscheinenden Zentren (Abb. 2, a—i, in den Resten der lysierten L-Form bei Nr. I und II) vergrößern sich während der Beobachtungszeit. Es handelt sich hierbei um kleine lebensfähige Plasmareste, die bei der Lyse einer

größeren L-Form übrig blieben. Durch solche Modifikationen des Teilungsvorganges (Größe der Individuen) mögen die von DIENES u. WEINBERGER (1951) beschriebenen 3A-Typ-Kolonien (große Formen) bzw. 3B-Typ-Kolonien (kleine Formen) entstehen. Der hier untersuchte Stamm neigt mehr zur Bildung der großen L-Einheiten. Deshalb zeigt die Beobachtung der Versuchsplatten im Durchschnitt größere Formen als die des Stammes 3.

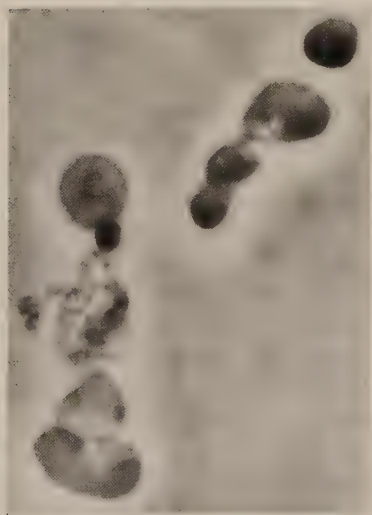
Prozentsatz der vermehrungsfähigen L-Einheiten. Die Beobachtung eines relativ raschen Wachstums der einzelnen L-Formen macht die langsame Entwicklung einer L-Kolonie schwer verständlich, wenn man nicht einen hohen Prozentsatz zugrunde gehender Zellen annimmt. Die Lyse einer großen Zahl auf frisches Medium geimpfter wie der im Laufe des Wachstums entstandener



i



k



l

Abb. 2. (Fortsetzung). i 19.00; k 20.00; l 22.00

L-Organismen zeigt bereits die Hinfälligkeit dieser Gebilde. Zur Bestimmung des Prozentsatzes der lebensfähigen L-Formen wurden 30 Agar-deckglaspräparate mit L-Phasen beimpft und der Prozentsatz der sich

entwickelnden Zellen durch Auszählung von je 5 Sehfeldern bestimmt. Es zeigt sich, daß die Zahl der vermehrungsfähigen Individuen außerordentlich schwankt, sie liegt zwischen 5 und 20%. Wenn man bei dieser großen Schwankungsbreite von einem Durchschnitt sprechen darf, so heißt das, daß durchschnittlich 10—15% der Zellen einer Kolonie lebensfähig sind.

3. Die Rückwandlung der L-Formen wurde in der Literatur verschiedentlich beschrieben (TULASNE 1951, BRINGMANN 1954). MEDILL u. HUTCHINSON (1954) berichten von der Rückwandlung einer 2μ großen L-Einheit über eine Fadenform, die sich in die Ausgangsbakterien segmentierte. Die Autoren trennen diese Rückwandlung streng von derjenigen der large bodies. Bei eigenen Studien der Rückwandlung der nicht stabilen L-Phase von *Proteus vulgaris*, Stamm 1 und 2, auf Normalmedium kamen morphologisch entsprechende L-Organismen, wie sie bei der Weiterentwicklung der L-Phase beobachtet wurden, zur Untersuchung. Es ist deshalb nicht verwunderlich, wenn wir Rückwandlungsformen erhielten, wie sie auch bei der Rückwandlung der großen Körper beschrieben wurden: Nach anfänglich formlosem Wachstum Bildung von Auswüchsen und Fadenformen. In pleomorphem Stadium frühzeitig einsetzende Beweglichkeit (siehe auch VON PRITTWITZ UND GAFFRON 1953), schließlich Segmentieren der Fäden in die normalen Bakterien.

Diskussion

Die in der Literatur beschriebenen Vermehrungsformen des L-Cyclus der Bakterien konnten von uns bei drei Stämmen von *Proteus vulgaris* unter dem Einfluß von Penicillin beobachtet werden. Neben Vermehrungszentren, pseudopodienartigen feinsten oder größeren Auswüchsen, flächigem Ausfließen des Plasmas und extracellulärer Bildung von L-Einheiten treten grob-amöboide Formen auf, die sich äqual oder inäqual teilen. Es handelt sich bei diesen Vermehrungsweisen um Modifikationen, die wohl von den Eigenarten eines Stammes abhängig sein mögen. In allen Fällen aber sistiert nach einer bestimmten Zeit Wachstum und Vermehrung: Die gebildeten L-Einheiten kugeln sich unter Volumenzunahme ab. Von ihnen gehen 85—90% im Durchschnitt zugrunde. Es war wünschenswert, ein Schema zu finden, das die Vorgänge des L-Cyclus von einem Grundtyp her verstehen läßt. Grundlegend für das hier zur Diskussion gestellte Schema war die eigene Auffassung, daß bei dem pleomorphen Charakter der L-Formen eine Beschreibung und Aufzählung morphologischer Besonderheiten derselben nichts zum Verständnis beiträgt. Es müssen vielmehr die Entwicklungsvorgänge der Einzelformen und die Summe der Entwicklungsformen eines Stammes oder einer Art zugrunde gelegt werden. Die

eigenen Beobachtungstatsachen lassen zwei Entwicklungsabschnitte vermuten:

1. Die progressive Wachstumsphase (Abb. 3, P). Diese Phase ist gekennzeichnet durch Wachstum und Vermehrung der L-Einheiten. Die Beobachtung der Entwicklungsvorgänge macht es unumgänglich, eine weitgehende Schädigung des Zellwandkomplexes anzunehmen (siehe auch STEMPEN u. HUTCHINSON 1951 und KLIENEGERBERGER-NOBEL 1951 b). Nach HÖPKEN u. BARTMANN (1955) wird bei der Bildung der large bodies das Wachstum der Zellwand gehemmt, während das plasmatische Wachstum weitergeht. Dadurch tritt das Plasma aus der Zelle. Das Vorliegen zellwandloser protoplasmatischer Gebilde erklärt die Formenmannigfaltigkeit der L-Einheiten und macht verständlich, daß eine morphologische Differenzierung zu keiner befriedigenden Deutung führen kann. Im wesentlichen werden es zwei Faktoren sein, die für das Entstehen der mannigfaltigen Formen — kugelige, amöboide Gebilde, kleinste Stäbchen oder Körnchen (Vermehrungszentren), fädige Bildungen oder actinomyceten-artige Wuchsformen — verantwortlich sind:

a) Innere Faktoren: Im aktiven Plasma treten Spannungsunterschiede (evtl. elektrostatischer Art) auf. Ohne formende Zellwände werden diese Spannungen mitbestimmend sein für die Form der plasmatischen Masse. Nimmt man für verschiedene Stämme auf Grund stammspezifischen Plasmas unterschiedliche Spannungen an, so werden Differenzen in der Formensumme erklärbar. Auch evtl. vorkommende filtrierbare L-Phasen fügen sich in dieses Schema ein: Es könnten feinste Vermehrungszentren (granuläre L-Phase) gebildet werden, die sonst bakteriendichte Filter passieren und bei guter Adaptation an das Medium Wachstum zeigen.

b) Äußere Faktoren: Ebenso werden äußere Faktoren mechanischer bzw. elektrostatischer Art mitbestimmend sein für die Form der zellwandlosen und deshalb besonders anfälligen L-Einheiten.

2. Die stationäre Phase (Abb. 3, S). Die L-Formen liegen nicht immer in solch extrem pleomorphen Wuchsformen vor. Sie kugeln sich nach einiger Zeit ab. Diese Umbildung kann reversibel sein (Abb. 2), d. h. es können auf gleichem Substrat progressive und stationäre Phase abwechseln. Nach einer bestimmten Zeit wird allerdings die Abkugelung irreversibel. Von den wahrscheinlich durch Plasmaentspannung entstehenden Kugelformen lysiert ein hoher Prozentsatz, die restlichen bleiben lebensfähig. Bei den kugeligen L-Einheiten handelt es sich nach der eigenen Auffassung um Ruhestadien. [Die von KANDLER u. KANDLER (1954 a) als Ruhestadien bezeichneten Gebilde entsprechen den B-Formen morphologisch unveränderter Zellen nach PULVERTAFT (1952), siehe auch VON PRITZWITZ UND GAFFRON (1953)]. Dieses Schema wird auch den Angaben gerecht, die die Kugel als typische Form der L-Organismen bezeichnen (DIENES 1953, RUBIO-HUERTOS, KÜSTER u.

FLAIG 1955, TULASNE u. BRINGMANN 1952). Es ist unter der Annahme formlabiler, zellwandloser L-Einheiten durchaus möglich, daß diese bei der Präparation für die Beobachtung im Elektronenmikroskop während der progressiven Wachstumsphase in Kugelformen übergehen. Es sprechen schließlich eigene Beobachtungen dafür, daß bei den Ruhestadien eine membranähnliche Grenzschiicht ausgebildet wird (RUBIO-HUERTOS, KÜSTER u. FLAIG 1955, STEMPEN 1955).

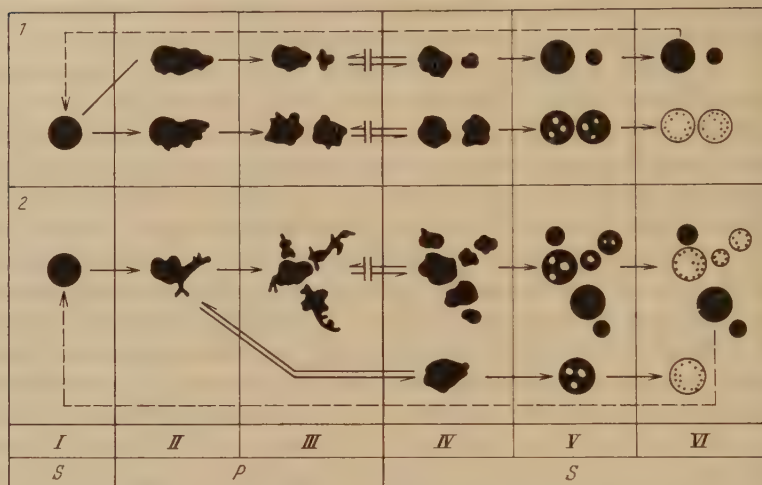


Abb. 3. Die L-Phase von *Proteus vulgaris*, 2 Möglichkeiten der Formmodifikation. P progressive Wachstumsphase (II und III); S stationäre Phase (IV—VI, I)

Von Bedeutung für die Entwicklungsvorgänge der L-Phase ist, daß diese nicht synchron verlaufen. Vielmehr kommen in relativ weitgespannten zeitlichen Grenzen progressive Wachstumsphase und stationäre Phase in einer Kultur nebeneinander vor.

Fragen der Nomenklatur. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bedürfen die bisherigen Bezeichnungen der innerhalb des L-Cyclus auftretenden Formen einer Nachprüfung. Der Vorschlag von HÖPKEN u. BARTMANN (1955), die L-Einheiten im Gegensatz zu den large bodies „kleine Körper“ zu nennen, scheint nicht ganz glücklich, ebenso die von LIEBERMEISTER u. KELLENBERGER (1956) angewendete Bezeichnung „globuläre Formen“. Es dürfen folgende Benennungen zur Diskussion vorgeschlagen werden:

1. Alle lebensfähigen Gebilde des L-Cyclus werden ohne Rücksicht auf Größe und Form „L-Einheiten“ oder „L-Formen“ genannt (LIEBERMEISTER 1953a). Evtl. vorkommende kleinste L-Einheiten können als L-Granula bezeichnet werden.

2. Nicht mehr entwicklungsfähige Formen, nach eigenen Beobachtungen stets kugelige, glatte Gebilde, können vorderhand noch als large bodies bezeichnet werden. (Siehe auch FREUNDT 1950, 1952.)

Zu 1: Wie bereits betont, wurde nach eigenen Beobachtungen kein morphologischer Unterschied zwischen den auf Penicillin-Agar gebildeten large bodies (Bezeichnung im Sinn der Literatur) und den eigentlichen L-Einheiten gefunden. Deshalb wurden die nicht zugrunde gegangenen „large bodies“ als L-Formen bezeichnet. Eine solche Benennung entspricht der eigenen Auffassung, daß die unterschiedliche Entstehungsweise allein nicht zu verschiedener Bezeichnung berechtigt. Neben der morphologischen Identität sprechen auch der gleiche Prozentsatz der Lebens- und Rückwandlungsfähigkeit, sowie analoge Rückwandlungsformen auf penicillinfreiem Substrat für die hier vorgeschlagene Bezeichnung.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit und der vorgeschlagenen Nomenklatur setzt sich eine L-Kolonie zusammen aus 10—15% lebensfähiger L-Einheiten und 85—90% large bodies in allen Phasen der Lyse, die in Zelldetritus eingebettet sind. Die L-Formen können sowohl in der progressiven Wachstumsphase als auch in der stationären Phase vorliegen. Der geringe Prozentsatz lebensfähiger Einheiten und die Häufigkeit der L-Formen sprechen für einen ziemlich weitgehenden Grad der Degeneration (FREUNDT 1950, 1952, HEILMANN 1941a, 1941b, OERSKOV 1942, RADLER u. RIPPEL-BALDES 1956). Es scheint uns verfrüht, irgendwelche Theorien über die funktionelle Bedeutung oder die Zugehörigkeit der L-Organismen aufzustellen (EDWARD 1953, 1954, FREUNDT 1950, OERSKOV 1942, RUSKA u. POPPE 1947, KLIENEBERGER-NOBEL verschiedene Arbeiten, siehe aber auch KLIENEBERGER-NOBEL 1953).

Zusammenfassung

Die L-Phase dreier Stämme von *Proteus vulgaris* unter der Wirkung von Penicillin wurde untersucht und ihre Entwicklungsvorgänge durch mikrophotographische Aufnahmeserien belegt. Neben der Bildung knospenartiger Vermehrungszentren und pseudopodienartiger Auswüchse konnte das flächige Ausfließen des Plasmas und die extracelluläre Bildung von L-Einheiten beobachtet werden. Bei zwei anderen Stämmen überwog die Vermehrung in kompakten, plasmatischen Massen durch Abschnürung größerer Teile und plumper Auswüchse.

Der Prozentsatz der lebensfähigen Einheiten liegt bei 10—15%. Bei der Übertragung der L-Einheiten auf penicillin-freies Substrat zeigten ebenfalls nur 10—15% eine Rückwandlung in die normale *Proteus*form. Der Prozentsatz ist gleich dem der Reproduktionsquote der large bodies. Auf Grund der gleichen Morphologie von L-Einheit und large bodies

mußte der Schluß gezogen werden, daß zwischen den in der Literatur verschieden bezeichneten Bildungen kein Unterschied besteht.

Nach den Ergebnissen der eigenen Beobachtungen wurde eine Unterteilung der L-Phase in zwei Abschnitte vorgeschlagen: In der progressiven Wachstumsphase erfolgt Wachstum und Vermehrung der L-Formen. Die Mannigfaltigkeit der Organismen läßt sich aus der Tatsache verstehen, daß keine Zellwand ausgebildet ist, d. h. daß das Penicillin unter anderem eine Schädigung des Zellwandkomplexes bewirkt. Eine stationäre Phase kann vorübergehend eintreten, sie tritt in allen Fällen nach einer bestimmten Zeit ein. Die L-Einheiten kugeln sich ab, ein hoher Prozentsatz von ihnen (85—90%) geht zugrunde. Zur Nomenklatur wird vorgeschlagen: Alle lebensfähigen Formen der L-Phase werden ohne Rücksicht auf Größe und Gestalt „L-Formen“ oder „L-Einheiten“ bzw. „L-Granula“ genannt. Die nicht mehr vermehrungsfähigen Gebilde sollten large bodies genannt werden.

Durchgeführte Filtrationsversuche verliefen negativ.

Literatur

- BRINGMANN, G.: Zbl. Bakter. I. Orig. **160**, 507 (1954); II. Orig. **107**, 497 (1954).
 DIENES, L.: J. Inf. Dis. **65**, 24 (1939). — Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **42**, 636 (1939); — J. Bacter. **44**, 37 (1942) **57**, 529 (1949); **66**, 274, (1953a); **66**, 280 (1953b). — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **11**, 51 (1946). — Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **64**, 166 (1947a); **66**, 97 (1947b); **71**, 30 (1949). — DIENES, L., and W. E. SMITH: J. Bacter. **48**, 125 (1944). — DIENES, L., and H. J. WEINBERGER: Bacter. Rev. **15**, 245 (1951). — DIENES, L., and P. C. ZAMECNIK: J. Bacter. **64**, 770 (1952). — DIENES, L., H. J. WEINBERGER and S. MADOFF: J. Bacter. **59**, 755 (1950).
 EDWARD, G. D. F.: J. Gen. Microbiol. **8**, 256 (1953); **10**, 27 (1954).
 FREUNDT, E. A.: Acta path. scand. (Kopenh.) **27**, 159 (1950); **31**, 561 (1952).
 HEILMAN, F. R.: J. Inf. Dis. **69**, 32, 45 (1941). — HÖPKEN, W., u. K. BARTMANN: Zbl. Bakter. I. Orig. **162**, 372 (1955).
 KANDLER, G., u. O. KANDLER: Arch. Mikrobiol. **21**, 178, 202 (1954). — Zbl. Bakter. II. Orig. **108**, 384 (1955). — KANDLER, O., u. G. KANDLER: Z. Naturforsch. **11b**, 252 (1956). — KANDLER, O., C. ZEHENDER u. J. MÜLLER: Arch. Mikrobiol. **24**, 209 (1956a); **24**, 209 (1956b); **24**, 250 (1956c). — KELLENBERGER, K., u. K. LIEBERMEISTER: Z. Naturforsch. **11b**, 206 (1956). — KLIENEBERGER, E.: J. of Path. **40**, 93 (1935). — J. of Hyg. **42**, 485 (1942). — KLIENEBERGER-NOBEL, E.: J. Gen. Microbiol. **3**, 435 (1949). — Bacter. Rev. **15**, 17 (1951a). — J. Gen. Microbiol. **5**, 525 (1951b). — VI. Internat. Cong. Microbiol. Sept. 1953, Riass di Consi Nr. 37. — KLIENEBERGER, E., and J. SMILES: J. of Hyg. **42**, 110 (1942). — KNÖLL, H.: Zeitschnachrichten 5. Folge H. **2**, 38 (1944).
 LIEBERMEISTER, K.: Zbl. Bakter. I. Orig. **160**, 250 (1953a). — Z. Naturforsch. **8b**, 757 (1953b). — LIEBERMEISTER, K., u. K. KELLENBERGER: Z. Naturforsch. **11b**, 200 (1956).
 MEDILL, M. A., and W. G. HUTCHINSON: J. Bacter. **68**, 89 (1954). — MEDILL, M. A., and D. J. O'KANE: J. Bacter. **68**, 530 (1954).
 NELLES, A.: Arch. f. Hyg. **294** (1955).

- OERSKOV, J.: Acta path. scand. (Køpenh.) **19**, 586 (1942).
- PIERCE, C. H.: J. Bacter. **43**, 780 (1942). — PRITTWITZ UND GAFFRON, J. VON: Naturwissenschaften **40**, 590 (1953). — PULVERTAFT, R. J. V.: J. of Path. **64**, 75 (1952); **65**, 175 (1953).
- RADLER, F., u. A. RIPPEL-BALDES: Arch. Mikrobiol. **23**, 400 (1956). — RIPPEL-BALDES, A., u. G. BUSCH: Nachr. Akad. Wiss. Göttingen, Biol.-phys.-chem. Abt. IIb, **4**, 23 (1954). — RIPPEL-BALDES, A., G. BUSCH u. F. RADLER: Arch. Mikrobiol. **23**, 423 (1956) — RUBIO-HUERTOS, M., E. KÜSTER u. W. FLAIG: Zbl. Bakter. I. Orig. **162**, 24 (1955). — RUSKA, H., u. K. POPPE: Z. Naturforsch. **2b**, 35 (1947).
- SCELLENBERG, H.: Zbl. Bakter. I. Orig. **161**, 425 (1954a); **161**, 433 (1954b). — STEMPEN, H.: J. Bacter. **70**, 177 (1955). — STEMPEN, H., and W. G. HUTCHINSON: J. Bacter. **61**, 321 (1951).
- TULASNE, R.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **143**, 286 (1949a). — Nature (Lond.) **164**, 376 (1949b). — Rev. d'Immunol. **15**, 223 (1951). — TULASNE, R., et G. BRINGMANN: Rev. d'Immunol. **16**, 322 (1952).
- VENDRELY, R., et R. TULASNE: Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris) **34**, 785 (1952).
- WEINBERGER, H. J., S. MADOFF and L. DIENES: J. Bacter. **59**, 765 (1950).

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen)

Studien zum Gestaltwandel der Bakterien (Bildung sarcinaähnlicher Formen bei einem gramnegativen, unbeweglichen Stäbchen*)

Von

H. BENDER

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. April 1957)

Vor allem in der älteren Literatur finden sich Angaben über die Umwandlung von stäbchenförmigen Bakterien in Kokken.

Eine solche Umbildung wurde durch Nährstoffarmut (BRAUN u. GERSBACH 1921, BRAUN u. SCHÄFER 1919, BREDEMAN 1909, GROHMANN 1924, LUTZ 1922, STAMM 1914), durch Desinfektionsmittel (BRAUN u. GERSBACH 1921, BRAUN u. SCHÄFER 1919), andere ungünstige Kulturbedingungen (BUCKSTEEG 1934/35, GARBOWSKI 1907, 1908, WINOGRADSKY 1902, siehe dazu ders. 1926) oder durch Salze (HEINZEL 1950/51, LUTZ 1922, PIETSMANN u. RIPPEN 1932, STAPP u. ZYCHA 1931, VOSS 1952) induziert. Arbeiten, die von der Umwandlung in „dauermodifizierte“ Kokken berichten, blieben nicht ohne Kritik (BREDEMAN 1909 siehe RUSCHMANN u. BAVENDAM 1925, HÜTTIG 1932 siehe KLIENECKER 1939, CUNNINGHAM u. JENKINS 1927). In gleicher Weise wurden Angaben über das Auftreten von Kokkenformen innerhalb eines bakteriellen „Lebenszyklus“ (LÖHNIS, ENDERLEIN, CUNNINGHAM) oder unter der Wirkung von Bakterienparasiten (KUHN) immer wieder angezweifelt.

Die Problematik derartiger Veränderungen bei Bakterien erschien uns reizvoll genug, um zufällig gemachte Beobachtungen durch eingehende Untersuchungen zu untermauern.

Methodik

Untersucht wurde ein Bakterium (im folgenden als Stamm *K* bezeichnet), das als Verunreinigung auf einer Platte erhalten, isoliert und rein gezüchtet wurde. (Nach der Bestimmung an Hand von BERGEYS Manual of Determinative Bacteriology handelt es sich um einen Vertreter der *Achromobacteriaceae*.) Vorliegen in unbeweglichen Einzel- oder Diplostäbchen, Länge durchschnittlich 1—4 μ , Breite 0,5—0,7 μ .

Substrat. a) Normalsubstrat: 2% iger Fleischwasser-Pepton-Agar, pH 7. — b) Versuchssubstrat: 1,5% iger Fleischwasser-Pepton-Agar, pH 7, + Magnesiumsulfat in Konzentrationen von 1—20%¹.

* Auszug aus dem zweiten Teil einer Dissertation „Studien zum Gestaltwandel der Bakterien (nach Untersuchungen an *Proteus vulgaris* und einem gramnegativen, unbeweglichen Stäbchen)“, der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät Tübingen 1956.

¹ Verwendet wurde kristallines Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) reinst von Merck.

Beimpft wurde entweder mit 0,5 ml der Suspension einer 24 Std alten Kultur von Stamm *K* in Fleischwasser-Pepton-Bouillon (Dichte 10^5 Zellen/ml), oder eine 24 Std alte Kultur wurde mit der Öse auf der getrockneten Platte ausgestrichen.

Bebrütet wurde bei 30° C.

Beobachtet wurden alle 6 Std die von den Versuchsplatten hergestellten Präparate. Dazu wurde mit der Platinöse ein kleines Stück Agar mit der beimpften Seite nach oben auf einen sauberen Objektträger gelegt und vorsichtig mit einem (mit Paraffinfüßchen versehenen) Deckglas bedeckt. Diese Methode gestattete die Untersuchung der Veränderungen in situ.

Alle Umwandlungen wurden durch Direktbeobachtung verfolgt und in mikrophotographischen Aufnahmeserien festgehalten. Die Agardeckglaspräparate wurden zur Belüftung hergerichtet, da es sich zeigte, daß die hier zu beschreibenden Umwandlungen aerob verlaufen: Zwei zu einem flachen Winkel gebogene, sterile Injektionsnadeln werden mit Siegellack auf dem sterilen Objektträger befestigt, Abstand der beiden Nadeln 12—14 mm. Unter sterilen Bedingungen wird ein kleines Stück des erkalteten Agars (Durchmesser bis 6 mm, Höhe 1—2 mm) zwischen die beiden Injektionsnadeln auf den Objektträger gebracht und mit wenigen Zellen der zu untersuchenden Bakterien beimpft. Das so hergerichtete Präparat mit einem Deckglas bedecken, leicht andrücken, so daß es auf den Nadeln aufliegt und mit reinem, flüssigem Paraffin sorgfältig verschließen. Eine der beiden Injektionsnadeln wird mit einem dünnen Gummischlauch an eine Druckluftquelle angeschlossen (Luft durch Wattefilter sterilisieren). Die Belüftung ist ausreichend, wenn in einem Kontrollgefäß alle 4—6 sec eine Blase aufsteigt. Zur Verhinderung eines zu raschen Austrocknens ist es zweckmäßig, die feuchtigkeitsgesättigte Druckluft etwas zu erwärmen. Die Agardeckglaspräparate wurden mit einem selbstgebauten Heiztisch bei 30° C bebrütet.

Färbungen wurden mit Methylenblau und Carbol-Fuchsin durchgeführt. Außerdem kam die GRAM-Färbung zur Anwendung.

Optische Ausrüstung. Die mikroskopischen Untersuchungen wurden durchgeführt am Ortholux-Forschungsmikroskop von Leitz mit dem Heineschen Kondensor zur Erzeugung des Phasenkontrastes. Die Mikroaufnahmen machten wir mit der Exacta Varex in der Kombination für Mikrophotographie (Mikroskopaufsatz und Objektivlupeneinsatz) auf Agfa Agepe-Dokumentenfilm und KB 14 Adox.

Ergebnisse

1. Umwandlung des Stammes *K* in sarcinaähnliche Formen (Abb. 1)

Substrat und Versuchsbedingungen. 1,5%iger Fleischwasser-Pepton-Agar, 14% Magnesiumsulfat, beimpft mit einer 24 Std alten Normalkultur von Stamm *K*. Bebrütung bei 30° C.

Im belüfteten Agardeckglaspräparat liegen die eingepfunden Zellen als typische Stäbchen vor (Abb. 1 a). Nach einer Inkubationszeit von 2 Std erfolgt Dickenzunahme (von 0,5—0,6 μ auf 1—1,2 μ), das sonst typische Längenwachstum unterbleibt (Abb. 1 b). Durch zahlreiche Querteilungen entstehen kokkoide Formen, deren Längsachsen im Vergleich zu den Ausgangsbakterien um 90° gedreht sind (Abb. 1 d). Die Einzelzellen vergrößern und teilen sich. Die Teilungsachsen liegen nicht parallel zu den vorhergehenden, sondern stehen senkrecht zu diesen (Abb. 1 d—f). Sie stehen außerdem senkrecht zu den durch die Bildung

der Kokkenzellen präformierten Längsachsen. Eine weitere Entwicklung erfolgt im Deckglaspräparat nicht.

Die Beobachtung der Versuchsplatten nach 6 bzw. 12 Std zeigt eine analoge Entwicklung: Nach 12 Std Bebrütung liegen zum großen Teil

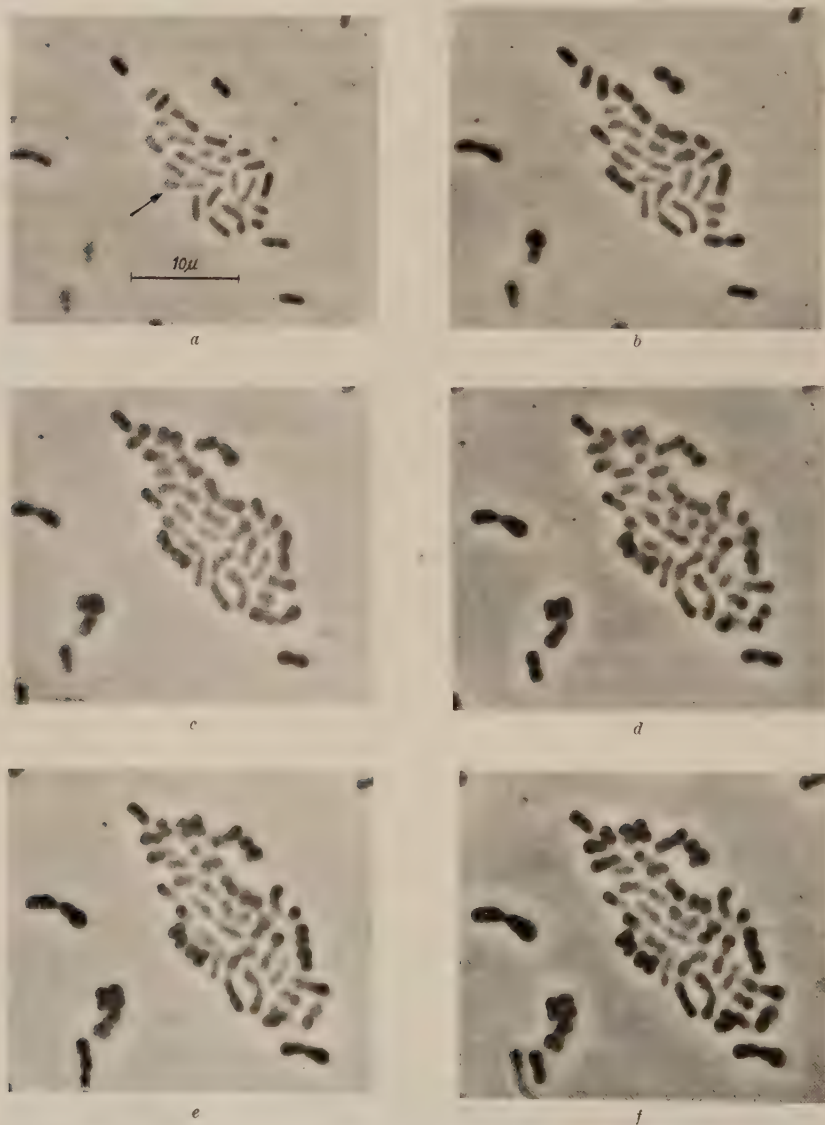


Abb. 1. Ausbildung sarcinaähnlicher Formen bei Stamm *K* unter dem Einfluß von 14% igem Magnesiumsulfat. (Die durch einen Pfeil gekennzeichnete Stelle zeigt die Entwicklung besonders gut.)
a 10.00 Uhr; *b* 12.00; *c* 13.15; *d* 14.30; *e* 17.00; *f* 19.00

Kokkentetraden vor. Die Größe der Kokken liegt bei $1,2\mu$. Das Wachstum erfolgt langsamer als das der stäbchenförmigen Bakterien auf Normalsubstrat. Die Abhängigkeit der Ausbildung sarcinaähnlicher Wuchsformen bei dem Versuchsbakterium von der Konzentration des Magnesiumsulfats wird aus Abb. 2 ersichtlich: Bis zu einer Konzentration von 4% keine wesentliche Veränderung, Kürzerwerden der Zellen von 4–8%, eine Drehung der Teilungsachse tritt aber nur bei 6% der eingepfunden Zellen auf. Bei weiterer Konzentrationszunahme steigt die Zahl der Kokkentetraden stark an. Die maximale Induktion einer zweiten Teilungsachse wird bei einer Konzentration von 14% Magnesiumsulfat erreicht mit 96% einer Umwandlung. Die restlichen 4% liegen als unveränderte Stäbchen und atypische Kugelformen vor.

Die p_H -Kurve der Abb. 2 zeigt, daß der p_H -Wert des Substrates mit der Erhöhung der Magnesiumsulfat-Konzentration nicht wesentlich verändert wird. Er sinkt auch bei einer Konzentration von 19% nicht unter 6,2.

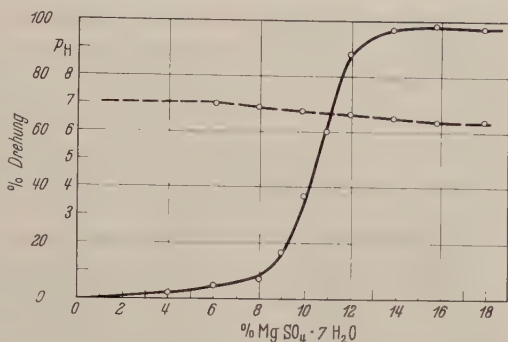


Abb. 2. Abhängigkeit der Bildung sarcinaähnlicher Formen bei Stamm K unter der Wirkung von Magnesiumsulfat. — Prozentsatz der Kokkentetraden; — — — p_H -Wert

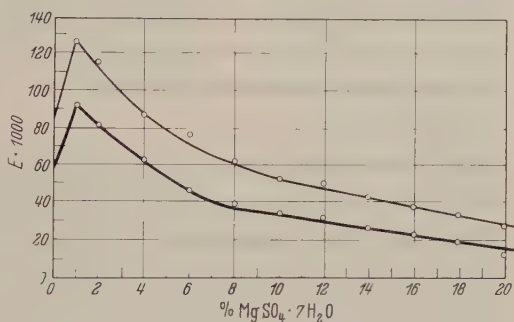


Abb. 3. Stamm K. Wachstumsverzögerung mit steigender Magnesiumsulfat-Konzentration. — nach 24 Std; — — — nach 48 Std

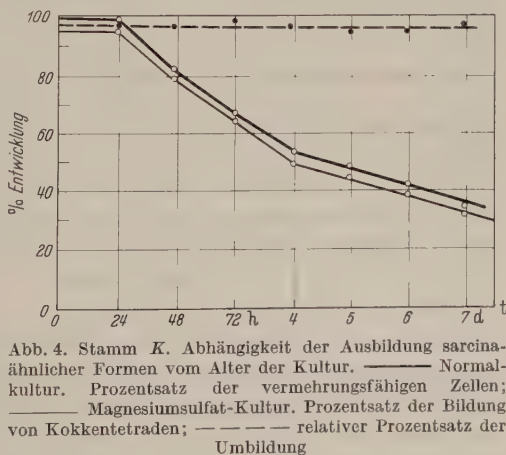


Abb. 4. Stamm K. Abhängigkeit der Ausbildung sarcinaähnlicher Formen vom Alter der Kultur. — Normalkultur. — — — Magnesiumsulfat-Kultur. — — — — — relativer Prozentsatz der Umbildung

Die obenerwähnte Wachstumsverzögerung wurde turbimetrisch an Kulturen in Hefeextrakt + Magnesiumsulfat untersucht. (Bei einer bakteriostatischen Giftwirkung müßte der Prozentsatz der gehemmten und deshalb nicht veränderten Zellen zunehmen [Voss 1952]). Bemerkenswert ist die stimulierende Wirkung geringer Konzentrationen des Magnesiumsulfats (Boas 1928, HEINZEL 1950/51, KLIENEGER 1930, MAASSEN 1904, WALTER 1947) (Abb. 3).

Eine Abhängigkeit der Tetradenbildung vom Alter der Ausgangskultur wird durch Abb. 4 veranschaulicht: Von einer Ausgangskultur wurden 7 Tage lang sowohl normales als auch magnesiumsulfathaltiges Medium beimpft, sowohl Deckglaspräparate als auch Versuchsplatten. Jeweils 5 Platten (30 Sehfelder) und 5 Agardeckglaspräparate (20 Sehfelder) wurden zur Errechnung eines Wertes herangezogen. Die beiden Kurven zeigen, daß der Prozentsatz der hier beschriebenen Umwandlung parallel zu dem der vermehrungsfähigen Zellen abnimmt, daß also die Zahl der gebildeten Sarcina-Formen relativ gleich bleibt.

2. Weiterzüchtung der Tetradenform unter gleichen Bedingungen (Abb. 5)

Substrat und Versuchsbedingungen. 1,5% iger Fleischwasser-Pepton-Agar, 14% Magnesiumsulfat. Beimpft mit Kokkentetraden einer 24 Std alten Versuchskultur. Bebrütung bei 30° C.

Im belüfteten Agardeckglaspräparat liegen die eingepflichten Zellen als Kokkentetraden, Diplo- oder Einzelkokken vor. Nach einer Volumenzunahme in der Lag-Phase erfolgen für Sarcinen typische Teilungen, dadurch gekennzeichnet, daß die aufeinanderfolgenden Teilungsachsen senkrecht zueinander stehen. Dabei ist von Bedeutung und soll in der Diskussion nochmals aufgegriffen werden, daß einer Teilung eine senkrecht zu ihr stehende Längenausdehnung vorausgeht (Abb. 5, a—f). Durch Absinken von Zellen in eine andere Einstellungsebene oder den Verlust der Teilungsfähigkeit einer Zelle kann die Beobachtung erschwert werden. Es entstehen traubige Verbände, die an Mikrokokken erinnern. Nach Voss (1952) ist ein Unterschied in der Teilungsweise zwischen Sarcinen und Mikrokokken durchaus fraglich.

Auf den Platten entstehen nach 24stündiger Bebrütung zarte, schwach graue Kolonien. Sie sind glattrandig und rund, im Gegensatz zu den weißlichen Kolonien mit gewelltem Rand der Normalform. Die mikroskopische Beobachtung zeigt denen im Agardeckglaspräparat analoge Formen. Der Prozentsatz der unveränderten Stäbchen und atypischen Zellen liegt bei 4%. Die Kokken sind gramnegativ wie die Normalform des Stammes *K*.

Eine Gewöhnung an das Magnesiumsulfat tritt nur insoweit ein, daß die beobachtete Wachstumsverzögerung (S. 37) nach der 4.—5. Passage auf dem Versuchssubstrat aufgehoben wird. Eine Adaptation, die sich in einer Abnahme der typisch veränderten Zellen zeigt, erfolgt nicht. Der Prozentsatz der Kokkenformen sinkt nach 10 Tagen auf gleicher Platte wie nach 23 Passagen in 46 Tagen nicht unter 90%. Das Fehlen einer

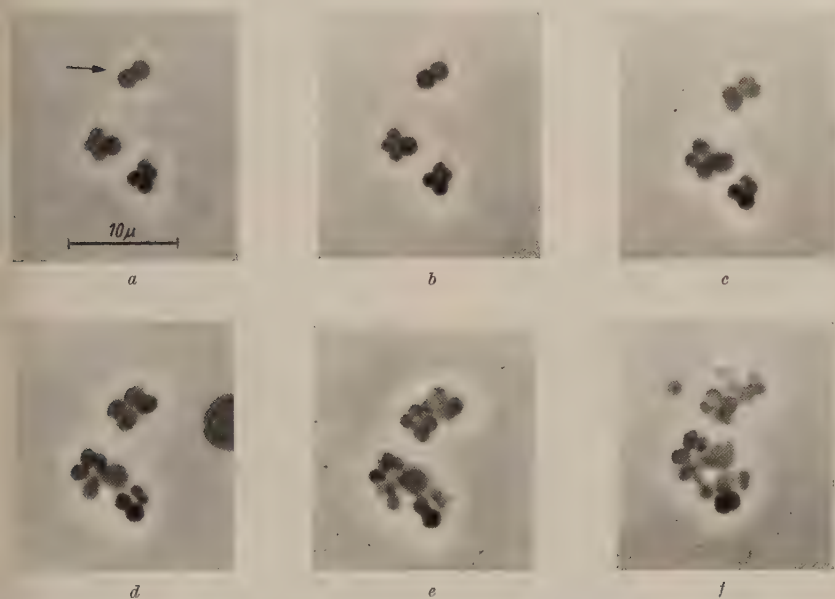


Abb. 5. Stamm *K.* Entwicklung der kokkoiden Formen auf magnesiumsulfathaltigem Substrat. *a* 12.00 Uhr; *b* 13.00; *c* 14.00; *d* 15.00; *e* 16.00; *f* 17.00

typischen Adaptation mag durch die relative Ungiftigkeit des Magnesiumsulfats erklärt werden (Voss 1952, siehe dazu auch BÖTTGER 1921, HEINZEL 1950/51, KATTERMANN 1930).

3. Rückwandlung der Kokken in Stäbchen auf Normalsubstrat (Abb. 6)

Substrat und Versuchsbedingungen: 1,5% Fleischwasser-Pepton-Agar, beimpft mit einer 24 Std alten Kokkenkultur von Stamm *K.* Bebrütung bei 30° C.

Die im belüfteten Agardeckglaspräparat vorliegenden Kokkentetraden, Diplo- oder Einzelkokken wachsen nach einer kurzen Inkubationszeit von 45 min in die Länge (Abb. 6, b—c). Offensichtlich wird auf magnesiumsulfatfreiem Substrat die Fähigkeit des Längenwachstums wiederhergestellt. Die zunächst entstehenden Kurzstäbchen nehmen nach 2—3 Teilungen die Form des Ausgangsbakteriums an

(Abb. 6, c—e). Beachtenswert sind die Rückwandlungsvorgänge der durch einen Pfeil gekennzeichneten Zellen (Abb. 6, a—c. Abb. 7): Eine Kokkentetrade, bei der die links gelegene Zelle die Teilung noch nicht

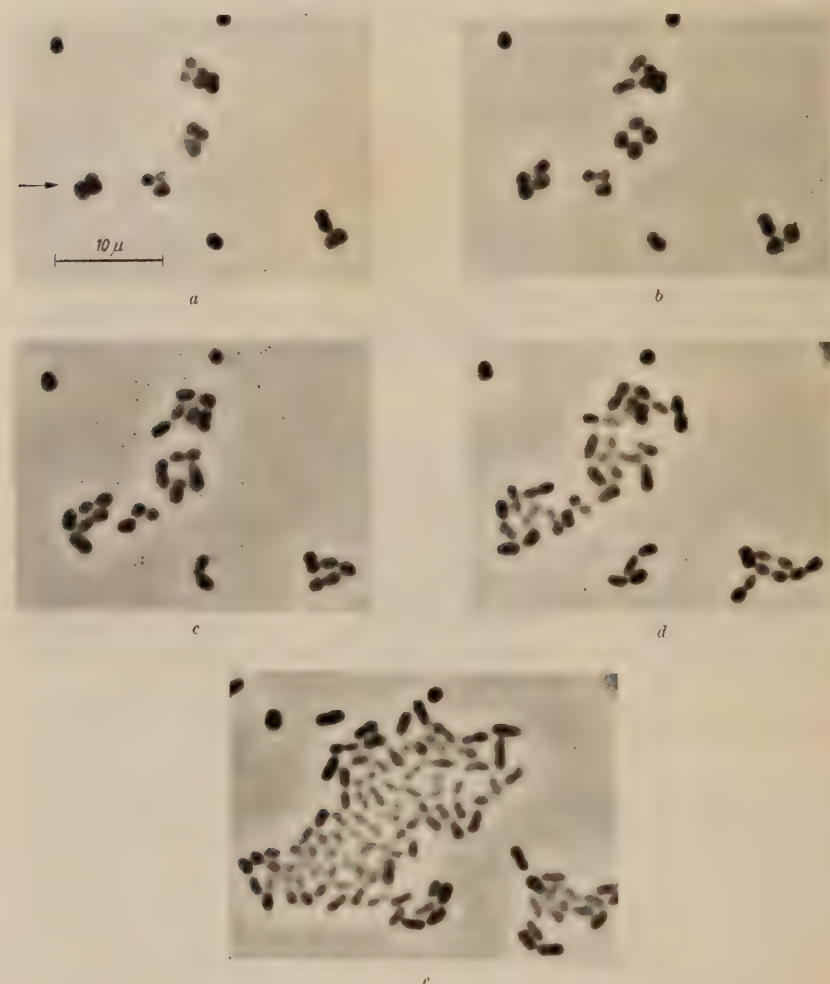


Abb. 6. Stamm K. Rückwandlung der Kokken auf magnesiumsulfatfreiem Substrat.
a 10.00 Uhr; b 10.45; c 11.15; d 12.00; e 13.15

durchgeführt hat. Die Bildung der stäbchenförmigen Bakterien erfolgt parallel zu der in der Kokkenphase präformierten Längsachse. Deshalb stehen die Längsachsen der Stäbchen senkrecht zueinander.

Auf den magnesiumsulfatfreien Platten bilden die Kokken bei raschem und üppigem Wachstum die Stäbchenphase zurück. Ein Rückfall in

die zweidimensionale Teilungsweise ist auch bei längerer Bebrütung nicht zu beobachten. Die rückgewandelten Stäbchen verhalten sich bei erneuter Impfung auf das magnesiumsulfathaltige Medium wie der Ausgangsstamm, d. h. sie zeigen keine erworbene Adaptation (HEINZEL 1950/51, Voss 1952).

Diskussion

Literaturangaben über die Bildung sarcinaähnlicher Wuchsformen bei stäbchenförmigen Bakterien sind recht selten (HASHIMOTO 1899, MATZUSCHITA 1900, ROBINOW 1949). Eine Beeinflussung des Teilungsvorganges bei Bakterien ist wohl verschiedentlich beschrieben worden (BURKE 1943, HINSHELWOOD 1947, SCHMIDT-KEHL 1930, Voss 1952), doch handelte es sich hierbei um den Verlust oder zumindest die Schädigung der Teilungsfähigkeit.

Folgende Faktoren wurden auf eine mögliche Bedeutung

untersucht und wirkungslos gefunden¹: a) quellende bzw. entquellende Ionenwirkung (HEINZEL 1950/51); b) osmotische Wirkung; c) Wirkung durch Veränderung der Hydratur (BURCIK 1950/51); d) Wirkung durch Veränderung der Oberflächenspannung (FROBISHER 1926).

Außer $MgSO_4$ üben einige andere Salze ($NaCl$, KNO_3 , NH_4Cl) einen ähnlichen, wenn auch wesentlich schwächeren und durch eine starke Schädigung gestörten Effekt auf den Teilungsmechanismus des Stammes *K* aus. Die der Normalform entsprechende Lebensfähigkeit der Kokken läßt einen Vergleich mit den in zahlreichen Arbeiten beschriebenen zum Teil degenerativen Kugelbildungen unter Salzeinfluß nicht zu (FISCHER 1906, GOTSCHLICH 1927, HAMMERL 1906, KIRCHENSTEINS 1923, MATZUSCHITA 1900, STAPP u. ZYCHA 1931, STERN 1919).

Dem hier zur Diskussion gestellten Schema der Wirkungsweise des Magnesiumsulfats müssen besonders zwei Annahmen zugrunde gelegt werden: Auch bei stäbchenförmigen Bakterien wird ein polar gerichtetes Prinzip (polar gerichtete Polypeptidketten) für das Längenwachstum verantwortlich sein (Abb. 8, A). Nach ROBINOW (1949) liegt dieses Prinzip in der Zellwand. Die Teilungen der wachsenden Stäbchen erfolgen stets quer zur Längsachse und parallel zueinander. Für diese empirisch gesicherte Querteilung werden verschiedene Faktoren verantwortlich

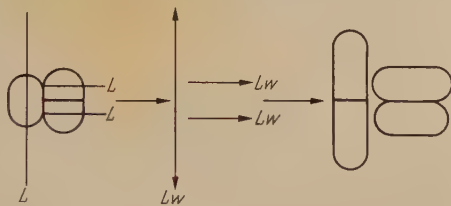


Abb. 7. Stamm *K*. Rückwandlung in der Abbildung durch einen Pfeil gekennzeichnete Kokken auf Normalmedium (schematisch).
L Längsachse; LW Längenwachstum

¹ Eine ausführliche Beschreibung dieser Versuchsserie findet sich in der Dissertation, S. 86—95.

sein: Oberflächenspannung (FROBISHER 1926), ein spezifisches Enzymsystem (HINSHELWOOD 1947), ein Faktor der Zellwand (ROBINOW 1949) oder ionar entquellende (HEINZEL 1950/51) bzw. osmotische Faktoren sind diskutiert worden.

Das Magnesiumsulfat (weniger typisch Kochsalz, Kaliumnitrat und Ammoniumchlorid) hemmt nun das polar gerichtete Wachstum. Das heißt, das für das Längenwachstum verantwortliche Prinzip wird reversibel geschädigt. Es wäre durchaus denkbar, daß durch eine reversible Aussalzung (Lösen von Nebervalenzen) die Ausrichtung der

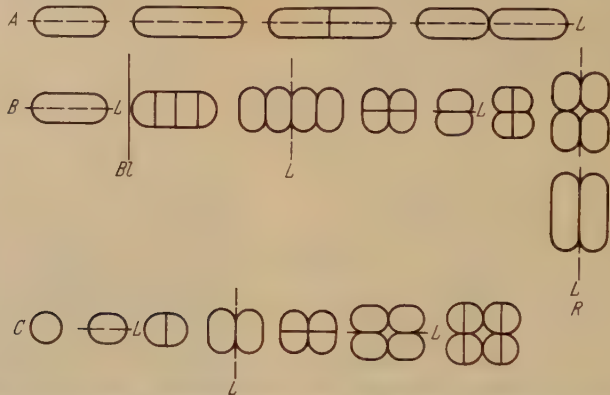


Abb. 8. Schema der Bildung sarcinaähnlicher Formen bei Stamm K im Vergleich zu Teilungsvorgängen bei stäbchenförmigen Bakterien und Sarcinen. A stäbchenförmiges, C kokkenförmiges Bakterium; B Stamm K auf Magnesiumsulfat-Agar; L Längsachse; BL Blockierung des Längenwachstums; R Rückwandlung

Polypeptidketten verlorengeht. [In ähnlicher Weise erhielt von WETTSTEIN (1953) bei *Funaria hygrometrica* unter der Wirkung von Chloralhydrat an Stelle fädiger Protonemen undifferenzierte kugelige Zellen]. Da keine Störung anderer Zellfunktionen durch Magnesiumsulfat erfolgt, tritt allseitiges Wachstum ein und führt durch die nachfolgenden Teilungen zu kokkoiden Zellen, deren Längsachse senkrecht zu der des ursprünglichen Stäbchens steht (Abb. 1; Abb. 8, B). Unter der Annahme, daß eine Teilung nur quer zur Längsausdehnung erfolgt, müßte die nächste Teilung senkrecht zur Längsachse der kokkoiden Zellen und damit senkrecht zu den Teilungen der Mutterzelle eintreten. Das ist in der Tat der Fall. Die weiteren Teilungsschritte der Kokkenphase unseres Versuchsbakteriums gehen analog dem Schema vor sich: Teilung — Präformation einer Längsachse in den Tochterzellen (die auch bei allseitiger Volumenzunahme nicht verlorengeht) — Teilung senkrecht zu ihr und damit zum vorhergehenden Teilungsschritt.

Die Annahme einer engen Beziehung zwischen der Längsachse einer Zelle und ihrer Polaritätsachse scheint berechtigt. Es ist deshalb

verständlich, wenn bei der Rückführung des Stammes *K* auf normales Substrat die Polarität parallel zu der präformierten Längsachse hergestellt wird (Abb. 6, Abb. 7).

Die Teilungsweise der Kokkenphase unseres Versuchsstammes zwingt einen Vergleich mit den Gattungen *Sarcina* bzw. *Gaffkya* auf. Bei diesen Bakterienformen scheint prinzipiell kein für Längenwachstum verantwortliches polares Prinzip vorhanden zu sein. Eine Untersuchung verschiedener Sarcinen ergab, daß auch diese artkonstanten Kokken während der logarithmischen Wachstumsphase Längsachsen ausbilden, die durch die jeweils vorangegangenen Teilungen präformiert werden. Am Ende der logarithmischen Phase treten mehr kugelige Zellen auf, die sich jedoch auf frischem Substrat erneut in zwei Tochterzellen mit Längenausdehnung teilen (Abb. 8, C).

Zusammenfassung

Unter dem Einfluß von 14% Magnesiumsulfat wurden bei einem Vertreter der *Achromobacteriaceae* durch Hemmung des Längenwachstums und simultan erfolgende Teilungen kokkoide Zellen ausgebildet. Diese Kokkenformen vermehrten sich entsprechend den Sarcinen mit zwei senkrecht aufeinander stehenden Teilungsachsen. Der Prozentsatz der so gebildeten Kokkentetraden betrug 96, eine Abhängigkeit der Bildung vom Alter der Kultur bestand nicht. Eine anfängliche Wachstumsverzögerung verschwand nach mehreren Passagen auf Magnesiumsulfat-Agar, diese Adaptation hatte jedoch keinen Einfluß auf den Prozentsatz der typisch veränderten Zellen.

Die Weiterzüchtung der Kokkenform auf dem Versuchssubstrat gelang leicht. Die Rückwandlung auf normalem Medium erfolgte durch eine Längenzunahme der kokkoiden Zellen bis zu typischen Stäbchen und Kurzstäbchen, die sich ohne Rückfall durch normale Querteilungen vermehrten.

Die Wirkungsweise des Magnesiumsulfats wurde so gedeutet, daß allein das für Längenwachstum verantwortliche Prinzip reversibel geschädigt wird.

Die Bildung sarcinaähnlicher Wuchsformen wurde durch die empirisch gesicherte Tatsache erklärt, daß bei Bakterien eine Teilung immer senkrecht zur Längsachse eintritt. Die bei dem Versuchsstamm unter dem Einfluß von Magnesiumsulfat auftretenden Kokken wie auch einige zum Vergleich untersuchte Sarcinen wiesen in der Wachstumsphase Längsachsen auf, die — durch die Teilungen präformiert — jeweils senkrecht aufeinander standen.

Literatur

BOAS, F.: Das phyletische Anionenphänomen. Jena 1927. Naturwissenschaften u. Landwirtsch. **14** (1928). — BÖTTGER, H.: Zbl. Bakter. II. **54**, 220 (1921). — BRAUN, H., u. A. GERSBACH: Z. Immunforsch. **33**, 247 (1921). — BRAUN, H., u.

H. SCHÄFER: Z. Hyg. **29**, 339 (1919). — BREDEMANN, G.: Zbl. Bakter. II. **23**, 385 (1909). — BUCKSTEEG, W.: Zbl. Bakter. II. **91**, 321 (1934/1935). — BURCIK, E.: Arch. Mikrobiol. **15**, 203 (1950/51). — BURKE, V.: J. of Bacter. **45**, 415 (1943).

CUNNINGHAM, A., and H. JENKINS: J. Agric. Sci. **17**, 107 (1927). — CUNNINGHAM, A.: Zbl. Bakter. II. **82**, 481 (1931a); **83**, 219 (1931b).

EISENBERG, P.: Zbl. Bakter. I Orig. **82**, 69 (1919). — ENDERLEIN, G.: Bacteriencyclogenie. Berlin u. Leipzig: W. de Gruyter u. Co. 1925. — Immunbiologica (1946, 1949, 1950).

FISCHER, A.: Ber. dtsh. bot. Ges. **24**, 55 (1906). — FROBISHER jr., M.: J. Infect. Dis. **38**, 66, 144 (1926).

GARBOWSKI, L.: Zbl. Bakter. II. **19**, 641, 737 (1907); **20**, 4, 99 (1908). — GOTSCHLICH, E.: Handbuch von KOLLE-WASSERMANN (1927). — GROHMANN, H.: Zbl. Bakter. II. **61**, 256 (1924).

HAMMERL, H.: Zbl. Bakter. I. **41**, 1 (1906). — HASHIMOTO, S.: Z. Hyg. **31**, 85 (1899). — HEINZEL, E.: Arch. Mikrobiol. **15**, 119 (1950/51). — HINSHELWOOD, C. N.: The Chemical Kinetics of the Bacterial Cell. Oxford 1947. — HÜTTIG, C.: Milchwirtsch. Forsch. **12**, 455 (1932).

KATTERMANN, G.: Bot. Arch. **28**, 73 (1930). — KIRCHENSTEINS, A.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **1**, 716 (1923). — KLIENEBERGER, E.: Erg. Hyg. **11**, 499 (1930). — Zbl. Bakter. I. **126**, 278 (1939). — KUHN, PH.: Berl. klin. Wschr. **1921**, 13. — Med. Klin. **1929**, 35.

LÖHNIS, F.: Mem. Nat. Acad. Sci. **16**, Washington (1921). — Zbl. Bakter. II. **56**, 529 (1922). — LUTZ, G.: Z. Hyg. **97**, 12 (1922).

MAASSEN, A.: Arb. a. d. kais. Gesundheitsamt Berlin Bd. **21**, 385 (1904). — MATZUSCHITA, T.: Z. Hyg. **35**, 495 (1900). — Zbl. Bakter. II. **9**, 257 (1902). — MEYER, K. H., u. M. DUNKEL: Z. physik. Chem. Ergänzungsband **1931**, S. 553.

PIETSCHMANN, K., u. A. RIPPEL: Arch. Mikrobiol. **3**, 422 (1932).

ROBINOW, C. F.: The Bacterial Cell, von R. J. DUBOS. Cambridge, Mass. Harvard Univ. Press. 1949, S. 376. — RUSCHMANN, G., u. W. BAVENDAMM: Zbl. Bakter. II. **64**, 340 (1925).

SCHMIDT-KEHL, L.: Arch. f. Hyg. **103**, 235 (1930). — STAMM, J.: Z. Hyg. **76**, 469 (1914). — STAPP, C., u. H. ZYCHA: Arch. Mikrobiol. **2**, 493 (1931). — STERN, K.: Ber. dtsh. bot. Ges. **37**, 334 (1919).

VOSS, E.: Arch. Mikrobiol. **18**, 101 (1952).

WALTER, H.: Die Grundlagen des Pflanzenlebens, Stuttgart 1947. — WETTSTEIN, D. von: Z. Bot. **41**, 199 (1953). — WINOGRADSKY, S.: Zbl. Bakter. II. **9**, 43 (1902). — Ann. Inst. Pasteur **40**, 455 (1926).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

Wirkung des Sauerstoff-Partialdrucks auf Wachstum und Stickstoffbindung von *Azotobacter chroococcum* Beij.

Von

WILHELM SCHMIDT-LORENZ und AUGUST RIPPEL-BALDES

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 17. April 1957)

Unter den nichtsymbiontischen stickstoffbindenden Bakterien gelten die *Azotobacter*-Arten bislang als streng aerob. In normaler Kultur erfolgt bestes Wachstum stets an der Grenze zwischen Kultursubstrat und Luft, also dort, wo optimaler Gasaustausch gewährleistet ist.

Nach WILSON u. WILSON (1941) sind Wachstum und N-Bindung eine Funktion der Oberfläche der Kultur und nicht des Volumens. Ähnlich erklärt sich auch die nach Zusatz von 0,1% Agar zur Kulturlösung zu beobachtende Wachstumsförderung (RIPPEL 1936; RIPPEL, BEHR u. NABEL 1938; BORTELS 1939). Durch Viskositäts-erhöhung des Mediums können die Bakterien infolge herabgesetzter Sinkgeschwindigkeit länger in den oberen Flüssigkeitsschichten verbleiben (RADLER 1955). Noch stärkere Wachstumsförderung kann durch direkte Kulturbelüftung erreicht werden (ALEXANDER u. WILSON 1954; RADLER 1955). Es bleibt allerdings noch unklar, ob es sich bei dieser Stimulierung von Wachstum und N-Bindung durch verstärkte Luftzufuhr lediglich um verbesserte Energieversorgung handelt oder ob auch direkte Beziehungen zum Mechanismus der N-Bindung selbst bestehen (WILSON u. BURRIS 1947).

Im Widerspruch hierzu stehen die Beobachtungen von MEYERHOF u. BURK (1928) sowie BURK (1930), wonach die N-Bindung von *Azotobacter* von der Zusammensetzung des einwirkenden Gasgemisches, also vom herrschenden Partial-Druck des Sauerstoffs (P_{O_2}) bzw. des Stickstoffs (P_{N_2}) abhängig ist. Die N-Bindung je Einheit Glucose-Verbrauch ist danach am größten bei sehr niedrigen O_2 -Partial-Drucken ($P_{O_2} = 0,04$ Atm.) und nimmt mit steigendem O_2 -Partialdruck immer mehr ab, bis schließlich bei einem P_{O_2} oberhalb 0,60 Atm. jegliches Wachstum gehemmt wird. Nicht nur die Bindung atmosphärischen Stickstoffs, sondern auch die Assimilation gebundenen, z. B. Ammon-Stickstoffs, soll bei höheren O_2 -Spannungen gehemmt sein (BURK 1930; BURK u. LINEWEAVER 1930).

Erst in jüngster Zeit wurden diese bislang nur wenig beachteten Arbeiten wieder aufgegriffen. PARKER (1954) konnte bei einem P_{O_2} von 0,04 Atm. doppelt bis dreifach so hohe N-Bindung als unter normalen Kulturbedingungen in Luft ($P_{O_2} = 0,21$ Atm.) nachweisen. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen TSCHAPEK u. GIAMBIAGI (1955), die die Abhängigkeit der N-Bindung vom O_2 -Partialdruck bei sehr niedrigen Kohlenhydratkonzentrationen ($< 0,1$ g/L) und in sehr dünner Flüssigkeitsschicht, wie sie den natürlichen Verhältnissen im Boden angepaßt sind, untersuchten. Erst unter diesen Bedingungen soll sich die Förderung der N-Bindung bei niedrigem O_2 -Partialdruck, oder wie es von den Autoren selbst ausgedrückt wird: „die Hemmung der N-Bindung durch den Sauerstoff“ voll

auswirken. Auf Grund dieser und anderer Versuche (TSCHAPEK u. GARBOSKY 1953; TSCHAPEK u. GIAMBIAGI 1954) kommen sie zu der Auffassung, daß *Azotobacter* nur „mikroaerophil“ sei, zwar nicht völlig ohne Sauerstoff wachsen und daher nicht gerade als fakultativ anaerober Organismus angesehen werden könne, in seinem Verhalten einem solchen aber sehr ähnlich wäre. Ganz im Gegensatz zu den bisherigen Auffassungen über die Ökologie von *Azotobacter* wird daraus die Vorstellung entwickelt, daß die günstigsten Wachstumsbedingungen in wenig durchlüfteten, feuchten Böden bzw. tieferen Bodenschichten gegeben und die oberen Bodenhorizonte zu gut durchlüftet sind, als daß es hier zu einer nennenswerten Vermehrung und Anreicherung kommen könnte. Dies soll auch der Grund dafür sein, daß es trotz vieler Versuche bisher noch nicht gelungen ist, die Menge des Boden-Stickstoffs mit Hilfe von *Azotobacter*-Impfungen zu erhöhen. Ähnlich deuten auch MEYERHOF u. BURK (1928) die Zunahme der N-Bindung mit abnehmendem O_2 -Druck als eine Anpassungserscheinung an die Verhältnisse in tieferen Bodenhorizonten.

Überwiegend wurden alle diese Ergebnisse mit einfachen stationären Kulturversuchen erreicht. Nach bestimmter Kulturdauer wurden alle unter verschiedenen Versuchsbedingungen stehenden Vergleichskulturen geschlossen abgebrochen und miteinander verglichen. Verhalten und Eigenschaften der Bakterien sind aber im Verlaufe des Wachstums wesentlichen Änderungen unterworfen, die durch derartige Versuchsanordnungen nicht erfaßt werden können. Es war daher Ziel der vorliegenden Untersuchung, durch fortlaufende Verfolgung von Wachstum und N-Bindung bei verschiedenen O_2 -Partialdrucken sowohl in freiem als auch mit gebundenem Stickstoff zur Klärung der Frage beizutragen, ob *Azotobacter* als aerober oder nur als mikroaerophiler Organismus anzusehen ist und inwieweit dabei Beziehungen zwischen O_2 -Effekt und N-Bindung eine Rolle spielen. Besonders aufschlußreich erschien unter gleichartigen Bedingungen die Gegenüberstellung des Wachstumsverlaufes von mehreren physiologisch unterschiedlich reagierenden Stämmen von *Azotobacter* und zwei als streng aerob bekannten N-heterotrophen Organismen — *Serratia marcescens* und *Torula utilis*.

Methodik

Es wurden in Kluverkolben, die mit Gasmischungen verschiedenen O_2 -Partialdruckes ständig durchlüftet wurden, das Wachstum durch fortlaufende gleichzeitige Bestimmung von Trockensubstanzbildung, N-Bindung bzw. Eiweißbildung, Kohlenhydratverbrauch und pH -Wert verfolgt.

1. Benutzte Bakterienstämme. Widersprechende Ergebnisse physiologischer Untersuchungen sind oft allein auf Nichtbeachtung von Stammesunterschieden, die gerade bei *Azotobacter* sehr weitgehend sein können (FISCHER 1950), zurückzuführen. Es wurden daher neben *Azotobacter vinelandii* noch 3 *Azotobacter-chroococcum*-Stämme unterschiedlichen physiologischen Verhaltens benutzt. Alle Stämme stammen aus Einzell-Kulturen und wurden auf Normal-Glucose-Agar nach FISCHER (1946) weiterkultiviert. Sie wurden ständig auf Reinheit, besonders auf Anwesenheit von Mikrokokken, die bei sogenannten reinen Kulturen von *Azotobacter* häufig mitgeschleppt werden, überprüft. — *Serratia marcescens* Bizio (= *Bacterium prodigiosum* Lehmann u. Neumann), ein stark farbstoffbildender Stamm, wurde auf

Pepton-Glucose-Agar kultiviert. — *Torula utilis* (Henneberg) = *Candida utilis* (Henneberg nov-comb.) wurde auf normalem Würze-Agar weiterkultiviert.

2. Kulturgefäße. Die Versuche wurden in 2 L-Kluyverkolben aus Jenaer Glas (Glasfritte G 3) durchgeführt. Jeder Kolben war mit einem dreifach durchbohrten Gummistopfen, der Impfstutzen, Gasaustrittsrohr und Heber zur sterilen Probenentnahme enthielt, verschlossen. Zur Sterilisation des eingeleiteten Gasgemisches war vor jeder Glasfritte ein längeres Wattefilter vorgeschaltet.

3. Kulturlösung. Die mineralische Grundnährlösung für *Azotobacter* hatte nach RADLER (1955) folgende Zusammensetzung: 0,1% KH_2PO_4 ; 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,0125% $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,0005% $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,015% CaCO_3 . Ausgangs-pH 7,4. — Für *Torula* nach KAUFMANN (1952): 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1% KH_2PO_4 ; 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,005% CaCl_2 . Ausgangs-pH 7,0. — Für *Serratia* nach SMITH u. JOHNSON (1954): 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$; 0,5% KH_2PO_4 ; 0,05% Na_2SO_4 ; 0,004% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,004% NaCl ; 0,004% $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,004% $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. Ausgangs-pH 7,2.

Nach gemeinsamem Ansatz wurden davon je 1000—1500 ml unter Zusatz von 0,5 g Antischaummittel (Wacker SH Kontroll-Nr. 153) in die Kluyverkolben eingefüllt und zusammen mit diesen bei 1,6 atü im Autoklaven sterilisiert.

Da nach MEYERHOF u. BURK (1928) sowie PARKER (1954) auch schon bei normalen Konzentrationen der C-Quelle von 1—2% ein deutlicher Effekt des O_2 -Partialdruckes festzustellen ist, wurde mit diesen Konzentrationen gearbeitet und dadurch die methodischen und analytischen Schwierigkeiten bei Verwendung sehr geringer Konzentrationen wie bei TSCHAPEK u. GIAMBIAGI (1955) vermieden. Als C-Quelle wurde ausschließlich Glucose reinst (Schuchardt) verwandt. Für jeden Kluyverkolben wurden entsprechend stärker konzentrierte Lösungen von je 100 ml getrennt im Dampftopf sterilisiert und vor dem Zusammensetzen der ebenfalls getrennt sterilisierten Aufsätze in jeden Kolben einzeln eingefüllt. Nach guter Durchmischung erfolgte sofort Probenentnahme aus jedem Kolben zur Bestimmung der Glucose-Anfangskonzentration.

4. Beimpfung. Zur Herstellung der Impfsuspension wurde die Bakterienmasse einer genau 48 Std alten Kultur in steriler physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und nach densitometrischer Bestimmung der Zellkonzentration stets konstante Zellmengen eingeimpft. Die Kultur-Temperatur war 25° C.

5. Belüftung. Voraussetzung für Wachstumsversuche bei unterschiedlichen Gas-Partialdrucken ist eine Kulturmethode, bei der Gleichgewicht zwischen Gas und Flüssigkeitsphase erreicht und aufrechterhalten werden kann. Abweichende Ergebnisse einzelner Autoren dürften hauptsächlich auf unterschiedliche Versuchstechnik zurückzuführen sein. PARKER (1954) sowie TSCHAPEK u. GIAMBIAGI (1955) arbeiteten mit ruhenden Flüssigkeitskulturen in sehr dünner Schicht und unbewegter Gasphase darüber, MEYERHOF u. BURK (1928) sowie BURK (1930) fast ausschließlich mit der Warburg-Technik. FIFE (1943) bezweifelt wahrscheinlich mit Recht, daß dabei befriedigendes Gleichgewicht zwischen beiden Phasen insbesondere bei sehr niedrigen O_2 -Partialdrucken überhaupt erreicht, geschweige denn aufrechterhalten werden kann und benutzte selbst direkte Kulturbelüftung mit zusätzlich eingebautem mechanischen Rührwerk. Für Wachstumsversuche, die laufend größere Probenentnahmen erforderlich machen, erscheinen Kluyverkolben am geeignetsten. Direkte Kulturbelüftung hat gegenüber stehenden Flüssigkeitskulturen den Vorteil, daß durch entsprechend lange Durchlüftung vor Impfung besonders bei niedrigen O_2 -Partialdrucken ein befriedigendes Gasgleichgewicht hergestellt und, so lange nicht zu große Mengen Trockensubstanz gebildet werden, auch längere Zeit aufrechterhalten werden kann.

Da die Porengrößen der einzelnen Fritten nie genau übereinstimmen, für den Gasaustausch mit der durchspülten Lösung aber Größe und Menge der durch die Fritte gebildeten Gasbläschen entscheidend ist, wurde in allen Versuchsreihen jeweils derselbe Kluyverkolben für jeden einzelnen Stamm benutzt.

Durchströmungsgeschwindigkeit und Zusammensetzung der Gasgemische wurde durch Mischung von N_2 und O_2 , gegebenenfalls auch CO_2 aus Bomben oder Druckluft in einem System untereinander verbundener Gasströmungsmesser nach NEVELING (Fa. E. Haage, Mülheim) und Gasströmungsregler (Fa. Dr. Müller, Düsseldorf) eingestellt und konstant gehalten¹. Für niedrigste O_2 -Partialdrucke wurde nicht völlig sauerstofffreier Bomben-Stickstoff, dessen O_2 -Gehalt nach HALDANE bestimmt wurde, benutzt.

6. Analytische Bestimmung des Wachstumsverlaufes. In geeigneten Abständen von 3—12 Std wurden nach guter Durchmischung ohne Abschaltung der Belüftung Proben von 50—100 ml, bei Versuchsende zum Teil noch mehr, entnommen. Nach pH -Bestimmung (mit Glaselektrode und Metrohm-Meßgerät Type E 196) und mikroskopischer Prüfung auf Reinheit wurden 20—30 ml der Kulturlösung zur Gesamtstickstoff-Bestimmung nach der üblichen Kjeldahl-Methode verwendet.

30—40 ml wurden 30 min bei 3000 U/min zentrifugiert und in der überstehenden Lösung der Restzuckergehalt nach der von ZELLER (1938) modifizierten Methode nach HAGEDORN-JENSEN bestimmt. Die Bakterientrockensubstanz wurde direkt nach Zentrifugieren, Waschen mit 0,2% HCl und Trocknen bei 105° C durch Wägung ermittelt. Gleichzeitig wurden nach Verdünnung der Kulturlösung mit 0,2% HCl auf 100—500 ml mit einem Leitz-Kompensationsphotometer, 20 mm Cuvetten und Filter 495, Trübungsmessungen durchgeführt. Im Gegensatz zu den Feststellungen von RADLER (1955) bei unbewegten Flüssigkeitskulturen besteht in Belüftungskulturen nur zu Beginn des Wachstums eine direkte Proportionalität zwischen Extinktion und Bakterientrockenmasse. Wahrscheinlich auf Grund der hierbei zum Teil sehr intensiven Schleimbildung nehmen mit fortschreitendem Wachstum die Werte der Trübungsmessung gegenüber denen der Wägung immer mehr ab. Die angegebenen Trockensubstanzwerte beruhen also zum größten Teil auf direkter Wägung, nur zu Beginn des Wachstums, wo zur Wägung zu geringe Mengen vorhanden sind, auf Trübungsmessung.

Ergebnisse

Wachstum bei verschiedenen Durchlüftungsintensitäten

Zunehmende Ertragssteigerung und Wachstumsstimulation bei steigender effektiver Belüftung ist sowohl bei *Serratia marcescens* (SMITH u. JOHNSON 1954) und *Torula utilis* (FINK 1939; SINGH, AGARWAL u. PETERSON 1948) als auch bei *Azotobacter* (WILSON u. ALEXANDER 1954) bekannt. Zum Vergleich der unterschiedlichen O_2 - bzw. Belüftungsansprüche der einzelnen Arten sowie zur Ermittlung der

¹ Wir danken Herrn Studienassessor HERMANN für die Überlassung der von ihm konstruierten und zusammengestellten Belüftungsanlage.

optimalen Belüftungsintensität wurde zunächst unter den gegebenen einheitlichen Versuchsbedingungen der Wachstumsverlauf bei verschiedenen Belüftungsintensitäten (0,125; 0,25; 0,5; 1,5 und 3,0 L Luft, $P_{O_2} = 0,21$ Atm./l Kulturlösung/Minute und stets gleich großer Konzentration der C-Quelle (Glucose 1,8%; bei *Azotobacter* 1,4%) durch laufende Bestimmung von Trockensubstanz- und Eiweißbildung verfolgt.

Die Wirkung gesteigerter Durchlüftungsintensitäten bei gleichbleibendem O_2 -Partialdruck (Luft, $P_{O_2} = 0,21$ Atm.) und gleicher Glucose-Anfangskonzentration auf den Wachstumsverlauf ist, gemessen an der Trockensubstanzbildung, bei allen drei Arten sehr ähnlich (Abb. 1—3): Vermehrungsrate und Wachstumsgeschwindigkeit werden stark erhöht, gleichzeitig nimmt die Trockensubstanzausbeute (Ö. K.) zu. Die Wachstumskurven verlaufen steiler und höher. Die für jede Art charakteristische Länge der Induktions- oder lag-Phase erfährt keine signifikante Änderung.

Besonders bei der stark O_2 -bedürftigen *Serratia marcescens* (Abb. 1) erfolgt fast proportional mit zunehmender Belüftung eine starke Steigerung des Zellertrags. Ähnlich wie bei SMITH u. JOHNSON (1954) werden für Bakterien ungewöhnlich hohe Ö. K.-Werte bis zu 30 erreicht (Tab.1). Die wesentlich geringeren Trockensubstanzausbeuten bei sehr niedrigen Belüftungsintensitäten erklären sich nicht allein aus einer reinen O_2 -Mangelwirkung. Bei Sauerstoffmangel setzt gleichzeitig anaerober Kohlenhydratstoffwechsel mit Milchsäurebildung ein. Die Erhöhung der H-Ionenkonzentration bewirkt dann sekundär weitere Wachstumshemmung.

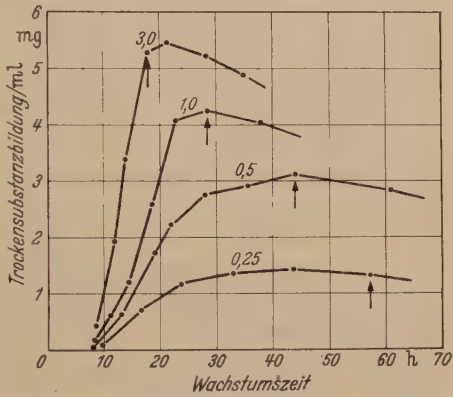


Abb. 1. *Serratia marcescens*. Verlauf der Trockensubstanzbildung bei zunehmender Belüftungsintensität (0,25—3,0 l/min/l). Glucose-Konz. 18 mg/ml. In dieser und den folgenden Abbildungen bedeutet ein \uparrow den völligen Glucoseverbrauch

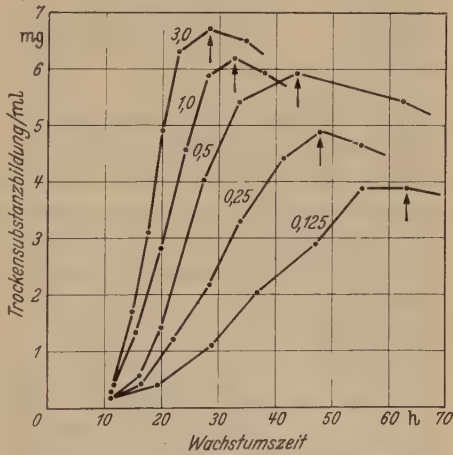


Abb. 2. *Torula utilis*. Verlauf der Trockensubstanzbildung bei zunehmender Belüftungsintensität (0,125—3,0 l/min/l). Glucose-Konz. 18 mg/ml

Tabelle 1. Trockensubstanzbildung, Ö. K., Eiweiß- und Fettgehalt von *Serratia*, *Torula* und *Azotobacter* St. 2001 bei steigenden Belüftungsinintensitäten

Belüftung l/min/1 l Lösung	<i>Serratia marcescens</i>				<i>Torula utilis</i>				<i>Azotobacter chroococcum</i> 2001				
	max. Trocken- masse mg/ml	Ö. K.	Eiweiß Prozent der Trocken- masse	Fett Prozent der Trocken- masse	max. Trocken- masse mg/ml	Ö. K.	Eiweiß Prozent der Trocken- masse	Fett Prozent der Trocken- masse	max. Trocken- masse mg/ml	Ö. K.	N-Bind. mg N/1 g verbr. Glucose	Eiweiß Prozent der Trocken- masse	Fett Prozent der Trocken- masse
0,125	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	3,87	21,3	54,0	3,7	2,64	18,5	11,1 ²	37,5	2,8
0,25	1,42	8,6	60,1	3,7 ¹	4,91	26,7	51,2	3,9	3,42	23,6	11,8	31,3	2,1
0,5	3,10	16,8	61,0	4,6	5,92	31,9	49,1	3,6	4,16	28,3	11,9	26,3	2,6
1,0	4,23	23,2	58,1	5,3	6,18	33,6	52,3	4,0	4,32	30,2	12,1	25,0	4,1
3,0	5,45	30,0	48,7	7,3	6,72	36,4	50,8	8,2	4,52	31,0	11,8	23,8	8,3

Tabelle 2. Trockensubstanzbildung, Ö. K., Eiweiß- und Fettgehalt von *Serratia*, *Torula* und *Azotobacter* bei steigenden Sauerstoff-Partialdrücken

P _{O₂} Atm.	0,008	0,02	0,04	0,21	0,40	0,60	0,85
	0,41	n. b.	1,72	3,15	4,43	6,73	4,11
	3,8	n. b.	10,6	17,0	24,5	37,2	22,1
	55,1	n. b.	57,0	61,0	51,0	50,3	48,1
	2,6 ¹	n. b.	2,3	4,8	8,2	9,1	9,0
	3,2	4,90	5,03	5,92	6,15	7,35	5,41
	17,6	26,6	27,6	31,9	33,1	40,2	29,6
	53,2	50,8	51,2	49,1	45,2	42,1	41,9
	2,4	3,7	3,1	3,6	8,1	10,2	10,3
	1,38	4,38	5,06	4,16	2,37	kein Wachstum	kein Wachstum
	27,2 ¹	30,2	35,0	28,3	16,1	kein Wachstum	kein Wachstum
	7,2 ²	14,7	15,8	11,9	10,5	(Glucoseanfangskonzentration 14,2—14,7 mg/ml)	
	16,0	30,2	28,3	26,3	40,8		
	2,8	3,6	3,1	2,6	6,9		

Mittelwerte aus jeweils 3—4 Wachstumskurven.

¹ Glucose infolge geschwächten Wachstums nicht völlig verbraucht.² Werte für N-Bindung relativ niedrig, da zum Zeitpunkt maximaler Trockensubstanzbildung N-Bindung bereits wieder abgenommen hat. Maximum liegt zu Beginn der log-Phase (s. Tab. 3).

Im Gegensatz zu *Serratia* werden bei der aeroben, aber auch stärker anaeroben Bedingungen besser angepaßten Hefe *Torula* (Abb. 2) ebenso wie bei *Azotobacter* (Abb. 3) schon bei den niedrigsten Belüftungsintensitäten relativ hohe Ö. K. (Tab. 1) erreicht (0,125 l/min/l *Torula* 21,3; *Azotobacter* 18,5). Bei unteroptimaler O₂-Versorgung dürfte hier die rein mechanische Durchmischung der Kulturlösung von wesentlichem Einfluß sein¹. Nach DE BECZE u. LIEBMANN (1944) konnte bei *Torula* allein durch Belüftung mit sauerstofffreien Gasen wie Kohlendioxyd oder Stickstoff der Zellertrag auf das 3—4fache gegenüber unbewegten Flüssigkeitskulturen erhöht werden. Auch SINGH, AGARWAL u. PETERSON (1948)

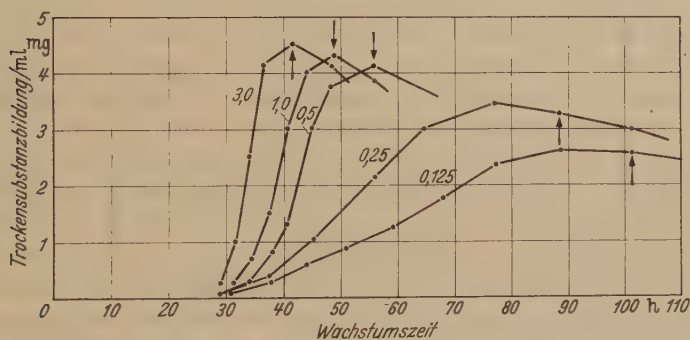


Abb. 3. *Azotobacter chroococcum* St. 2001. Verlauf der Trockensubstanzbildung bei zunehmender Belüftungsintensität (0,125—3,0 l/min/l) in N-freier Kulturlösung. Glucose-Konz. 14 mg/ml

weisen darauf hin, daß gerade bei *Torula* die mechanische Durchmischung von wesentlich größerem Einfluß auf die Trockensubstanzausbeute ist als einfache Belüftung allein. Sichtbarster Effekt erhöhter Belüftung ist sowohl bei *Torula* als auch bei *Azotobacter* weniger die Steigerung der Trockensubstanzbildung als eine ausgeprägte Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit. Mit steigender Belüftung wird maximaler Zellertrag in immer kürzerer Wachstumszeit erreicht, wobei die Höhe der Trockensubstanzausbeute wiederum von der Wachstumsgeschwindigkeit abhängig ist. Bei langsamerem Wachstum wird mehr von der vorhandenen Menge der C-Quelle im Betriebs- oder Nebenstoffwechsel, der sich z. B. bei *Torula* bei den niedrigsten Belüftungsintensitäten als anaerobe Alkoholbildung zeigt, verbraucht und steht damit weniger für den Aufbau von Zellsubstanz zur Verfügung.

In Übereinstimmung mit den Feststellungen von SMITH u. JOHNSON (1954) bei *Serratia* und FINK u. LECHNER (1938), SINGH, AGARWAL u. PETERSON (1948) bei *Torula* wird der Eiweißgehalt der Trockenmasse von der Belüftung wenig beeinflusst (Tab. 1) und ist nur bei stärkster

¹ Vgl. dazu noch E. GREVE: Arch. f. Mikrobiologie 26, 254 (1957) für *Saccharomyces*.

Belüftung zugunsten einer erhöhten Fettsbildung etwas verringert. Das gleiche ist bei *Azotobacter* bei Assimilation gebundenen Stickstoffs der Fall.

Bei Wachstum mit freiem Luft-Stickstoff — also ohne Zugabe gebundenen Stickstoffs zur Kulturlösung — wird bei *Azotobacter* die Höhe der N-Bindung je Einheit verbrauchter Glucose (mg N/g Glucose) durch unterschiedliche Belüftung nicht beeinflusst. Bei steigender Belüftung nimmt auch hier der maximale Zellertrag zu. Bei gleichbleibender N-Bindung und damit Eiweißbildung handelt es sich also lediglich um vermehrte Bildung nichteiweißhaltiger Substanzen. Im Gegensatz zur Assimilation gebundenen Stickstoffs, wobei im übrigen Wachstum und Trockensubstanzbildung sehr ähnlich wie bei Bindung von Luftstickstoff in Abb. 3 verlaufen, bleibt daher der Eiweißgehalt der Bakterientrockenmasse nicht konstant, ist in unbelüfteter Kultur am höchsten und nimmt mit zunehmender Belüftungsintensität stark ab. Bei stärkster Belüftung wird zwar die größte Trockensubstanzausbeute und der höchste Ö. K. erreicht, gleichzeitig aber ist nur ein sehr geringer Eiweißanteil, bis höchstens 20—25%, vorhanden. Bereits RADLER (1955) hat auf diesen bisher noch wenig beachteten Unterschied zwischen unbewegten Flüssigkeitskulturen mit relativ langsamem Wachstum und 65—75% Eiweiß und stark belüfteten, schnell wachsenden Kulturen mit nur 20—25% Eiweiß, wobei in beiden Fällen die Höhe der N-Bindung gleich ist, hingewiesen.

Wachstum bei verschiedenen Sauerstoff-Partialdrucken

In jeder Versuchsreihe wurden gleichzeitig 6 Kulturkolben (1mal *Serratia*, 1mal *Torula* und 4mal *Azotobacter*-Stämme) mit einem konstanten Gasstrom von 0,5 l/min/1 l Lösung durchlüftet. Es wurde nacheinander in jeweils 2—3 Wiederholungen der Wachstumsverlauf bei den O₂-Partialdrucken von 0,008, 0,02, 0,04, 0,21, 0,40, 0,60 und 0,85 Atm. verfolgt.

N-Heterotrophe

Bei den beiden N-Heterotrophen *Serratia* und *Torula* werden ganz analog der Steigerung der Belüftungsintensität durch Erhöhung des O₂-Partialdruckes bei konstantem Belüftungsgrad Wachstumsgeschwindigkeit und Trockensubstanzausbeute (Ö. K.) stark gefördert. Vor allem bei *Serratia* ist der Verlauf der Wachstumskurve mit der Zunahme der Belüftung (Abb. 4) fast identisch. Es liegen hier praktisch die gleichen Bedingungen vor. Während dort bei konstantem O₂-Partialdruck der Sauerstoffgehalt der Lösung durch stärkeren Gasstrom gesteigert wird, ist hier bei konstanter Geschwindigkeit des Gasstroms die Sauerstoffkonzentration des Gases erhöht, woraus wiederum ein höherer Sauerstoffgehalt der Lösung resultiert, da die Löslichkeit des Sauerstoffs in

Wasser bei konstanter Temperatur dem Partialdruck direkt proportional ist (bei reinem Sauerstoff 5mal größere Löslichkeit in Wasser als bei Luft). Erst bei einem P_{O_2} über 0,85 Atm. erfolgt wahrscheinlich durch

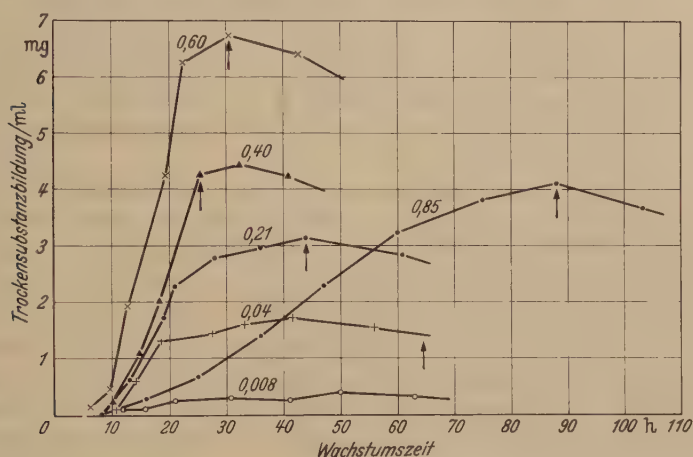


Abb. 4. *Serratia marcescens*. Verlauf der Trockensubstanzbildung bei unterschiedlichem O_2 -Partialdruck (0,008—0,85 Atm.). Glucose-Konz. 18 mg/ml

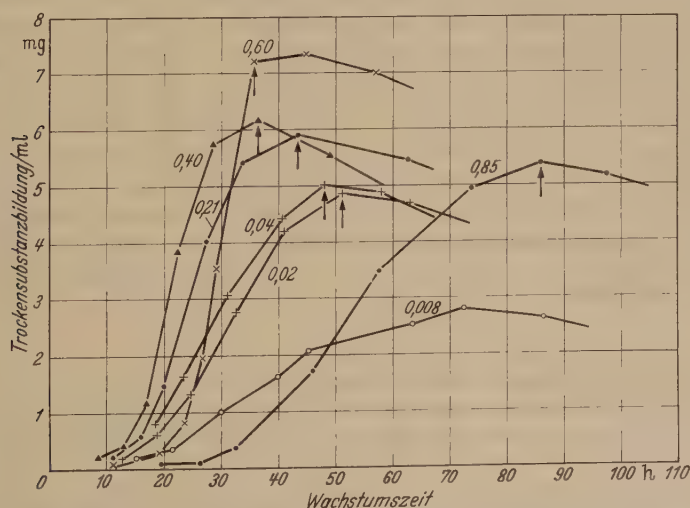


Abb. 5. *Torula utilis*. Verlauf der Trockensubstanzbildung bei unterschiedlichem O_2 -Partialdruck (0,008—0,85 Atm.). Glucose-Konz. 18 mg/ml

toxische Nebenwirkungen des reinen Sauerstoffs selbst zunehmend merkliche Depression von Wachstumsgeschwindigkeit und Gesamtertrag. Aber auch noch in reinem Sauerstoff ($P_{O_2} = 1,0$ Atm.) ist bei

beiden Arten zwar stark reduziertes aber noch deutliches Wachstum nachzuweisen.

Auch der Eiweißgehalt der Trockensubstanz bleibt unabhängig vom O_2 -Partialdruck nahezu konstant (Tab. 2) und ist nur bei den höchsten O_2 -Spannungen infolge verstärkter Fettbildung etwas verringert. Es besteht also eine Abhängigkeit des Wachstums vom O_2 -Partialdruck nur insoweit, bis der optimale Sauerstoffgehalt der Lösung erreicht wird. Bestimmender Wachstumsfaktor ist allein die Sauerstoffversorgung der Kultur.

Zum Unterschied gegenüber *Serratia* ist bei *Torula* (Abb. 5) bei sonst völlig entsprechenden Bedingungen der Beginn sichtbaren Wachstums bei PO_2 über 0,60 Atm. stärker verzögert, die Induktions- oder lag-Phase erfährt eine geringe zeitliche Verlängerung.

Bei *Azotobacter* läßt sich bei Wachstum mit gebundenem Stickstoff (als Ammon-Phosphat¹), wobei nach BURRIS u. WILSON (1947) die Bindung von Luftstickstoff sofort und vollständig gehemmt wird, im Gegensatz zu den Feststellungen von MEYERHOF u. BURK (1928) und BURK u. LINEWEAVER (1930), die allerdings Wachstum und N-Assimilation nur auf Grund von Respirationsmessungen in der Warburg-Apparatur ermittelten, keinerlei Abhängigkeit der Stickstoff-Assimilation vom O_2 -Partialdruck nachweisen (in Abbildungen und Tabellen nicht aufgenommen). Genauso wie bei den N-Heterotrophen *Serratia* und *Torula* nehmen mit steigendem O_2 -Druck Wachstumsgeschwindigkeit und Trockensubstanzausbeute zu (Abb. 6); so bleibt der Eiweißanteil unbeeinflußt vom O_2 -Partialdruck mit 48—51% annähernd konstant. Als einziger Unterschied setzt die Hemmwirkung hoher O_2 -Konzentrationen nicht erst oberhalb $PO_2 = 0,80$ Atm. ein, sondern das Wachstum wird bereits bei einem PO_2 von 0,60 Atm. stärker sistiert, Wachstumsgeschwindigkeit und Trockensubstanzausbeute werden verringert. Aber auch hier ist zwar stark verlangsamtes und gehemmtes, aber noch deutlich nachweisbares Wachstum bis zu einem PO_2 von 1,0 Atm. festzustellen.

N-Autotrophe

Um lediglich auf besondere Stammeigenschaften beruhende Unterschiede auszuschließen, wurden gleichzeitig in parallelen Versuchsreihen 4 physiologisch unterschiedlich reagierende *Azotobacter*-Stämme untersucht. Der Stamm *Azotobacter chroc. 1608* (Abb. 8) zeichnet sich durch hohe Reservestoffbildung (RADLER 1955) aus, während der Stamm *Azotobacter chroc. 2001* (Abb. 3, 6 u. 7) wenig Reservestoff,

¹ Es wurde nur das Wachstum mit Ammon-Phosphat geprüft, da bei Anwendung von Nitrat-N den Vergleich zur N-Fixierung erschwerende Nebenwirkungen auftreten. Während bei Ammon-N sofortige N-Aufnahme erfolgt, ist die Nitrat-Assimilation verzögert und setzt erst nach gewisser Adaptationszeit ein. Dies bedingt eine von O_2 -Partialdruck unabhängige lag-Phasenverzögerung. Die Fixierung des freien Luftstickstoffs wird erst nach Erreichen der vollen Nitrat-Assimilation vollständig gehemmt.

dafür um so mehr Eiweiß bildet. Die Stämme *Azotobacter vinelandii* 1607 (Abb. 9) und *Azotobacter chroc.* 1609 sind in ihrem Verhalten einander sehr ähnlich und bilden außerordentlich viel Schleim.

Zum besseren Vergleich wurden aus den Analysendaten der einzelnen Wachstumskurven N-Bindung, Ö. K. und Eiweißbildung nach Bildung von jeweils 0,25; 0,5; 1,0 usw. mg Trockensubstanz/ml berechnet und deren Werte bei den unterschiedlichen O_2 -Partialdrücken gegenüber gestellt (Tab. 3).

Bei Wachstum in freiem, elementarem Luftstickstoff — also ohne Zugabe gebundenen Stickstoffs zur Kulturlösung (Abb. 7—9) — ist bei *Azotobacter* die Wirkung steigenden O_2 -Partialdrucks gerade umgekehrt wie bei den N-Heterotrophen. Der Ertrag an Trockensubstanz ist bei niedrigem P_{O_2} von 0,02—0,04 Atm. am größten und nimmt mit zunehmender Steigerung des O_2 -Partialdruckes immer mehr ab, bis schließlich bei einem P_{O_2} von 0,60 Atm. das Wachstum völlig gehemmt ist.

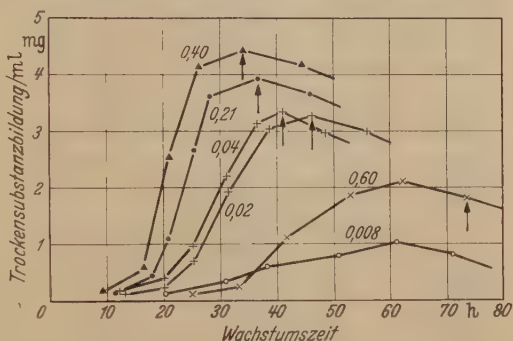


Abb. 6. *Azotobacter chroococcum* St. 2001. Verlauf der Trockensubstanzbildung bei unterschiedlichem O_2 -Partialdruck (0,008—0,60 Atm.) mit gebundenem Stickstoff (Ammon-Phosphat). Glucose-Konz. 14 mg/ml

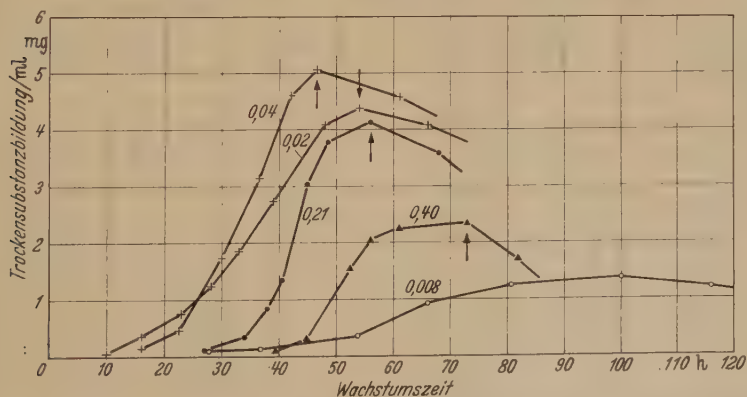


Abb. 7. *Azotobacter chroococcum* St. 2001. Verlauf der Trockensubstanzbildung bei unterschiedlichem O_2 -Partialdruck (0,008—0,40 Atm.) in N-freier Kulturlösung. Glucose-Konz. 14 mg/ml

Unter rein anaeroben Bedingungen ist keinerlei Entwicklung möglich. Aber bereits bei einem P_{O_2} von 0,008 Atm. setzt geringes Wachstum ein. Die erreichten Trockensubstanzausbeuten sind sehr klein, die vorhandene C-Quelle wird nur zu einem geringen Teil verbraucht. Bei derartiger

Tabelle 3. N-Bindung, Ö. K., Eiweißgehalt und Schleimanteil von *Azotobacter*-Stämmen während des Wachstums in Durchlüftungskulturen bei unterschiedlichen Sauerstoff-Partialdrucken

gebildete Trocken- substanz mg/ml	N-Bindung mg N/g Glucose-Verbrauch Po ₂				Ö. K. Po ₂				Eiweiß Prozent der Trockenmasse						
	0,008	0,02	0,04	0,021	0,40	0,008	0,02	0,04	0,21	0,40	0,008	0,02	0,04	0,21	0,40
Azotobacter chrooc. 2001 (Eiweißbildner)															
0,25	6,7	15,1	16,2	13,9	12,5	11,9	13,5	15,6	13,9	8,9	35	70	65	62,5	87,5
0,5	6,7	18,1	20,0	13,6	10,8	15,2	18,9	22,7	20,0	10,9	27,5	60,0	55,0	42,5	63,0
0,75	6,8	18,4	18,4	13,2	10,8	18,3	20,2	24,2	21,4	12,7	23,4	56,7	47,5	38,4	54,3
1,0	7,3	17,8	18,0	13,4	10,9	20,4	22,5	25,6	22,7	13,0	22,5	49,4	43,7	37,0	52,5
2,0	—	16,8	17,0	13,4	10,7	—	22,8	27,0	26,0	15,6	—	46,4	38,8	32,2	42,8
3,0	—	15,1	16,8	12,8	—	—	25,4	27,0	26,8	—	—	37,1	38,0	30,0	—
4,0	—	14,5	16,1	12,0	—	—	29,0	31,2	27,8	—	—	31,2	32,4	27,0	—
5,0	—	—	14,2	—	—	—	—	34,5	—	—	—	—	25,6	—	—
Azotobacter chrooc. 1608 (Reservestoffbildner)															
0,25	—	12,6	—	11,3	11,5	—	(0,015) ¹ 13,1	—	16,7	12,5	—	(0,015) ¹ 60,0	—	42,5	57,5
0,5	—	13,3	15,8	14,8	12,0	—	18,5	26,3	20,0	12,5	—	45,0	37,5	46,2	60,0
0,75	—	12,7	16,1	14,3	11,5	—	21,8	28,9	21,4	14,7	—	36,7	35,0	41,7	49,2
1,0	—	12,4	15,3	14,1	11,1	—	24,4	29,4	22,7	16,2	—	31,8	32,5	38,8	43,7
2,0	—	11,2	14,9	13,8	10,8	—	33,8	32,5	24,8	19,2	—	21,6	28,4	34,8	35,0
3,0	—	11,7	15,0	13,2	10,5	—	38,7	35,7	29,0	21,4	—	18,1	26,2	28,6	30,6
4,0	—	—	14,5	11,8	—	—	—	36,4	31,2	—	—	—	25,0	25,5	—
5,0	—	—	14,1	—	—	—	—	36,0	—	—	—	—	24,7	—	—

Azotobacter vinelandii 1607 (Schleimbildner)														
0,25	3,0	—	11,4	16,5	8,7	10,9	—	8,6	12,5	9,3	27,5	—	82,5	67,5
0,5	4,0	—	17,3	13,3	10,8	11,1	—	14,7	13,9	9,8	22,5	—	74,0	65,1
0,75	—	—	16,3	13,4	10,3	—	—	16,3	15,0	11,2	—	—	62,5	57,5
1,0	—	—	16,2	13,0	10,0	—	—	17,8	16,6	11,6	—	—	56,0	53,7
2,0	—	—	15,6	12,8	10,1	—	—	20,8	19,2	16,3	—	—	47,0	45,6
3,0	—	—	14,2	12,5	—	—	—	22,4	20,8	—	—	—	39,8	—
Schleim gebildet mg/ml														
0,5	0,33	—	0,02	0,03	0,02	0,66	—	0,4	0,6	0,4	Schleim, Prozent der Zelltrockenmasse			
0,75	—	—	0,08	0,08	0,06	—	—	1,1	1,1	0,8				
1,0	—	—	0,15	0,13	0,12	—	—	15	13	12				
2,0	—	—	0,7	0,72	0,78	—	—	35	36	36				
3,0	—	—	2,0	1,66	—	—	—	67	55,4	—				
maximal	—	—	(2,63)	—	—	14,2	—	98	58,5	39,6				

Alle Zahlen aus den Analysendaten der jeweiligen Wachstumskurven (Abb. 7, 8 u. 9) berechnet und auf die gebildete Menge Trockensubstanz bezogen.

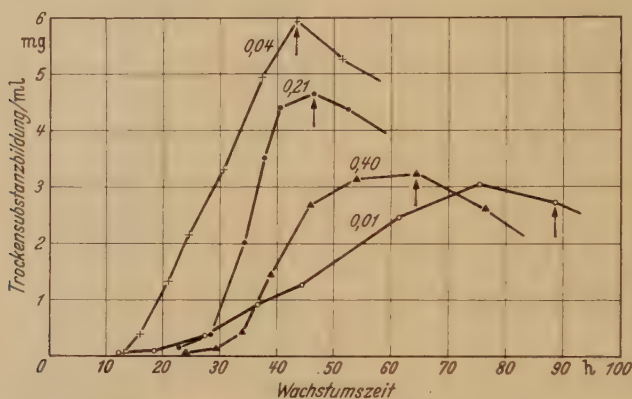
¹ Hier (bei St 1608) ausnahmsweise $PO_2 = 0,015$.

niedrigen O_2 -Konzentrationen kommt der Sauerstoff ins Minimum. Dagegen steht bei allen höheren O_2 -Partialdrucken bei ständiger Durchlüftung wesentlich mehr Sauerstoff zur Verfügung als zur vollständigen Oxydation aller vorhandenen Glucose gebraucht würde.

Bei der bereits von MEYERHOF u. BURK (1928) sowie TSCHAPEK u. GIAMBIAGI (1955) nachgewiesenen Wachstumshemmung durch höhere O_2 -Partialdrucke über 0,60 Atm. handelt es sich nicht um einfache

Wachstumssistierung, sondern um irreversible Zellschädigung. Auch nach 10—12 tägiger, dauernder Belüftung war keinerlei Glucoseverbrauch nachzuweisen. Wurde danach auf Belüftung mit einem PO_2 von 0,02—0,21 Atm. umgeschaltet, so wuchsen die Kulturen nicht mehr an. Auch Überimpfungen auf die verschiedensten Nährböden mit und ohne gebundenen Stickstoff waren ohne Erfolg. Nur nach 1—2 tägiger Belüftung wuchsen noch einige Keime an. Nach relativ kurzer Belüftungszeit mit derart

hohen O_2 -Partialdrucken werden die Zellen also abgetötet. Bei Wachstum mit gebundenem Stickstoff tritt keinerlei derartige Zellschädigung auf, sondern es ist im Gegenteil noch schwaches Wachstum bei Belüftung



bb. 8. *Azotobacter chroococcum* St. 1605. Verlauf der Trockensubstanzbildung bei unterschiedlichem O_2 -Partialdruck (0,01—0,40 Atm.) in N-freier Kulturlösung. Glucose-Konz. 14 mg/ml

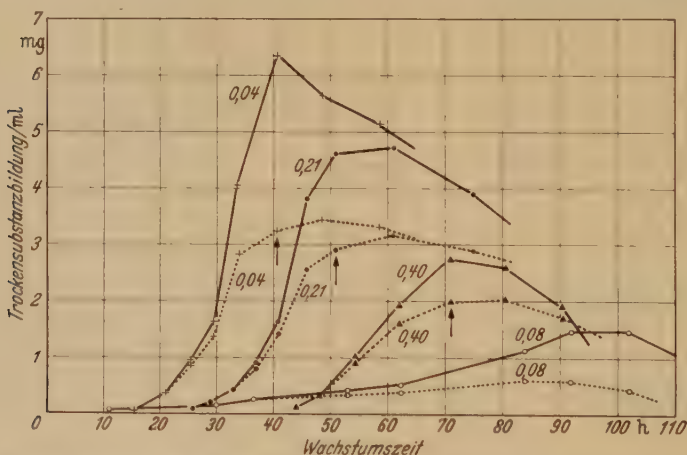


Abb. 9. *Azotobacter vinelandii* St. 1607. Verlauf der Trockensubstanz- und Schleimbildung bei unterschiedlichem O_2 -Partialdruck (0,008—0,40 Atm.) in N-freier Kulturlösung. Glucose-Konz. 14 mg/ml (untere Kurven jeweils reine Bakterientrockenmasse, obere Kurve: Gesamttrockenmasse = Bakterientrockenmasse + Schleimtrockensubstanz)

mit einem P_{O_2} von 0,85 Atm. möglich, auch wachsen die Bakterien einer solchen Kultur in normalen Medien wieder gut an. Eine Erklärung für diese Befunde ist vorerst nicht möglich.

Während des Wachstumsverlaufes ist die Höhe der N-Bindung nicht konstant. Unabhängig vom jeweiligen O_2 -Partialdruck liegt das Maximum zu Beginn der log-Phase. Mit fortschreitendem Wachstum

nimmt die N-Fixierung langsam ab und erreicht zum Zeitpunkt der höchsten Trockensubstanzbildung gegen Ende des Wachstums ihren niedrigsten Wert (Tab. 3). Nur ein Vergleich dieser Maxima der N-Bindung gibt ein eindeutiges Bild von der Wirkung unterschiedlicher O₂-Partialdrucke. Bei relativ geringer Bakterienmasse und begrenzter Probenentnahme zu Beginn des Wachstums können die Analysenwerte nicht völlig genau sein. Es wurde daher die N-Bindung bei allen 4 Stämmen bei den verschiedenen O₂-Partialdrucken nochmals in je 3 Parallelkulturen unter Anwendung größerer Mengen Kulturlösung zu Beginn der log-Phase bestimmt (Tab. 4).

Tabelle 4. Höhe der N-Bindung bei Belüftung mit verschiedenen O₂-Partialdrucken bei vier *Azotobacter*-Stämmen

Po ₂ Atm.	Azotob. chr. 2001 (Eiweißbildner)		Azotob. chr. 1603 (Reservestoffb.)		Azotob. chr. 1609 (Schleimbildende Stämme)		Azotob. vineland, 1607	
	N-Bin- dung ¹	Prozent ²	N-Bin- dung	Prozent	N-Bin- dung	Prozent	N-Bin- dung	Prozent
0,008	6,7	— 68	n.b.	n.b.	4,1	— 77	6,3	— 65
0,02	19,2	— 7	15,3	— 10	17,3	— 2	17,2	— 5
0,04	20,8	100	16,9	100	17,6	100	18,1	100
0,08	18,1	— 13	15,1	— 10	n.b.	n.b.	16,9	— 6
0,21	13,2	— 36	13,8	— 18	13,4	— 24	14,0	— 23
0,40	10,7	— 48	11,2	— 34	10,4	— 41	10,9	— 40
0,60	kein Wachstum							

¹ N-Bindung = mg N fixiert/g Glucoseverbrauch zu Beginn der log-Phase (nach Bildung von etwa 0,25—0,75 mg/ml Trockensubstanz). Mittelwerte aus je 3 Parallelkulturen.
² Höchste N-Bindung bei Po₂ 0,04 Atm. = 100%; die Zahlen geben die Verminderung in Prozent an.

Bei Po₂ = 0,008 Atm. ist die N-Bindung sehr gering. Hier dürfte neben allen anderen Stoffwechselprozessen auch die N-Bindung primär durch absoluten O₂-Mangel sistiert sein. Das Maximum der N-Bindung liegt bei allen 4 Stämmen bei den nur wenig höheren O₂-Partialdrucken von 0,02—0,04 Atm. Die zum Teil recht beträchtlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen sind wohl allein auf physiologische Stammesunterschiede zurückzuführen, denn auch bei den Stämmen mit geringer N-Bindung ist das Maximum nicht nach oben oder unten verschoben. Mit Steigerung des O₂-Druckes nimmt die N-Fixierung zunehmend stärker ab, bis bei Po₂ = 0,40 Atm. das N-Bindungsvermögen um fast die Hälfte verringert ist. In den schneller wachsenden Belüftungskulturen ist die Abnahme der N-Bindung, der Unterschied zwischen niedrigen und hohen O₂-Partialdrucken bei weitem nicht so groß wie bei den anderen Autoren (MEYERHOF u. BURK 1928; TSCHAPEK u. GIAMBIAGI 1955 sowie PARKER 1954), die in belüfteten Kulturen bei niedrigem

O₂-Partialdruck von 0,02—0,04 Atm. doppelt bis dreifach so hohe N-Bindung als in Luft nachweisen konnten. Immerhin ist auch hier gegenüber der höchsten N-Bindung bei Po₂ = 0,04 Atm. diese bei Luft um 18—36%, bei Po₂ = 0,40 Atm. um 34—48% erniedrigt.

Verzögerung der Induktionsphase

Sichtbarste Wirkung des erhöhten O₂-Partialdruckes auf den Wachstumsverlauf ist die Beeinflussung der Induktions- oder lag-Phase. Bei den N-Heterotrophen sowie bei *Azotobacter* im Falle heterotropher N-Ernährung ist die Induktionsphase sowohl bei steigender Belüftungsintensität als auch bei zunehmendem O₂-Partialdruck stets gleich lang (Abb. 1—5). Lediglich bei *Torula* ist sie bei O₂-Partialdrucken über 0,60 Atm. (Abb. 5) etwas verlängert. Bei *Serratia* wird die lag-Phase bei derart hohen O₂-Drucken sogar noch etwas verkürzt (Abb. 4). Beides ist aber nicht sehr signifikant, die Unterschiede sind nur sehr gering und nicht immer eindeutig reproduzierbar.

Bei Bindung von Luftstickstoff wird dagegen bei *Azotobacter* mit zunehmendem O₂-Partialdruck die Induktionsphase eindeutig mehr und mehr verlängert, der Wachstumsbeginn also immer mehr verzögert (Abb. 7—9). Im typischen Falle setzt sichtbares Wachstum bei einem Po₂ von 0,02—0,04 Atm. bereits nach 10—15 Std Belüftung, bei Luft (Po₂ = 0,21 Atm.) erst nach 25—30 Std und bei einem Po₂ von 0,40 Atm. erst nach 35—45 Std ein. Diese Verlängerung der Induktionsphase mit zunehmendem O₂-Partialdruck tritt bei allen geprüften Stämmen auf. Es bestehen nur graduelle, keine prinzipiellen Unterschiede untereinander.

Normalerweise ist die Geschwindigkeit des Anwachsens einer Bakterienkultur weitgehend durch das Alter und die Menge eingimpfter Keime bedingt. Da bei der gewählten Versuchsanordnung nicht gleichzeitig Belüftung mit verschiedenen O₂-Partialdrucken, sondern immer nur in einer Versuchsreihe ein bestimmter Partialdruck eingestellt werden konnte, war die Verwendung nie völlig gleichen Impfmateri als nicht zu vermeiden. Um diese Fehlerquelle so weit wie möglich auszuschließen, wurde besonderer Wert auf konstantes Alter der Impfkulturen (48 Std) gelegt und die Einsaatmenge durch Trübungsmessung möglichst genau auf 0,1 mg Trockensubstanz/ml = etwa $2,5 \times 10^7$ Keime/ml eingestellt. Davon wurden als Impfsuspension für 1500 ml Kulturlösung je 5 ml verwendet, woraus sich eine Bakterien-Anfangskonzentration von annähernd 8×10^4 /ml ergibt.

Versuche mit verschiedenen Einsaatmengen ergaben, daß der lag-Phasen-Effekt um so deutlicher ausgeprägt und besser reproduzierbar ist, je geringere Einsaatmengen verwandt werden. Bei sehr hohen Impfmengen geht der charakteristische Unterschied der lag-Phasenverzögerung zwischen dem Po₂ von 0,02 und 0,21 Atm. etwas zurück, bleibt aber in jedem Falle bei höherem Po₂ von 0,40 Atm. stets deutlich erhalten. Kontrollversuche mit Impfmateri verschiedenen Alters ergaben nur relativ geringe Unterschiede.

Veränderungen des CO_2 -Gehaltes der Belüftungsgase von 0,02—1,5% waren ohne jeglichen Einfluß auf die typische, lediglich vom Po_2 abhängige lag-Phasenverzögerung und den gesamten Wachstumsverlauf. Der lag-Phaseneffekt ist also unabhängig vom CO_2 -Gehalt der Durchlüftungsgasgemische.

Bei laufenden Abimpfungen aus den verschiedensten Wachstumsstadien einer wachsenden Kultur in frische Belüftungskulturen desselben oder höheren O_2 -Partialdruckes tritt immer wieder die für den betreffenden Po_2 charakteristische Verzögerung der Induktionsphase ein. Der ausschließlich vom O_2 -Partialdruck abhängige lag-Phasen-Effekt wird also weder durch das physiologische Alter des Impfmateri als noch durch Selektion gegenüber höheren O_2 -Drucken resistenter Keime beeinflusst.

Ö. K. und Schleimbildung

Bei wachsenden Mikroorganismen-Kulturen ist normalerweise der Ö. K. zu Beginn des Wachstums am höchsten und nimmt infolge zunehmender Atmung, verstärkten Erhaltungsstoffwechsels und Verbrauch anfangs gespeicherter Zellinhaltsstoffe mit zunehmendem Kulturalters ab. Unabhängig von der Art der Belüftung ist dies sowohl bei *Torula* und *Serratia* als auch bei *Azotobacter* bei heterotropher N-Ernährung der Fall. Im Gegensatz hierzu nimmt bei *Azotobacter* bei Bindung von Luftstickstoff der Ö. K. mit zunehmendem Wachstumsalter laufend zu, es wird also je Einheit verbrauchter Glucose immer mehr Trockensubstanz gebildet (Tab. 3). Da gleichzeitig die Höhe der N-Bindung abnimmt, wird der prozentuale Eiweißgehalt der Bakterientrockenmasse im Laufe des Wachstums immer geringer. Es wird wahrscheinlich als eine Art Reservesubstanz zunehmend stärker nichteiweißhaltige Zellsubstanz gebildet.

Rein physiologisch kann auch die starke Schleimbildung bei den Stämmen 1607 und 1609 als eine derartige Reservestoffbildung angesehen werden, nur daß hier die Reservesubstanz nicht in der Zelle gespeichert, sondern in Form von Schleim in das umgebende Kulturmedium ausgeschieden wird. Durch quantitative Schleimbestimmung läßt sich zeigen, daß im Gegensatz zu Pneumokokken, bei denen stärkste Schleimbildung gerade zu Beginn des Wachstums erfolgt (BUKANTZ, COOPER u. BULLOWA 1941), bei *Azotobacter* bis zur mittleren Wachstumsphase nur sehr wenig Schleim ausgeschieden wird und intensive Schleimbildung erst gegen Ende des Wachstums einsetzt (Abb. 9). Dann allerdings herrscht größte Schleimbildung vor, die Eiweißbildung wird stark eingeschränkt und die noch vorhandene Glucose fast völlig in Schleim umgewandelt, so daß über die Hälfte der Gesamttrockensubstanz nur aus Schleim besteht (Tab. 3). Die noch zu Beginn größter Schleimbildung vorhandene Menge Glucose reicht aber allein nicht zur Bildung derart

großer Mengen Schleim aus. Wie auch die plötzliche Abflachung der Kurve für Bakterientrockensubstanz zeigt (Abb. 9), muß ein Teil des Schleimes in dieser Wachstumsphase durch Umwandlung bereits vorher in der Zelle gespeicherter nichteiweißhaltiger Substanzen entstanden sein. Nach völligem Glucoseverbrauch nimmt der Anteil gebildeten Schleimes wieder schnell ab und wird als zusätzliche C-Quelle genutzt, denn gleichzeitig dauern N-Bindung und Eiweißbildung noch einige Zeit weiter an. Auch dies unterstreicht die Reservestoffnatur dieser Substanzen. Analog der Schleimbildung verläuft auch die Speicherung von Zellinhalts-substanzen während des Wachstums beim nichtschleimbildenden Stamm 1608, dessen Reservestoff bereits von RADLER (1955) untersucht und der bisher weder als Eiweiß noch als Kohlenhydrat noch als Lipide identifiziert werden konnte.

Nach COOPER u. PRESTON (1937) soll bei Frischisolierungen sehr starke, bei älteren Stammkulturen kaum oder nur sehr geringe Schleimbildung auftreten. Nach den eigenen Feststellungen verhält sich das gerade umgekehrt. Von den 4 im Belüftungsversuch geprüften Stämmen zeigten gerade die am längsten in der Institutssammlung gehaltenen Stämme die größte Schleimbildung, während bei den beiden anderen, frisch isolierten Stämmen keinerlei Schleim nachzuweisen war. Unter weiteren 27 Frischisolierungen aus den verschiedensten Böden der Umgebung Göttingens konnten nur 2 Stämme mit nennenswerter Schleimbildung nachgewiesen werden. Bezeichnend ist, daß bei genauer Durchsicht der Angaben von FISCHER (1946) bei über 70 Neuisolierungen der verschiedensten Herkünfte auf festen Nährböden nur in 6 Fällen gute Schleimbildung beobachtet werden konnte. Auch die beiden jetzt im Belüftungsversuch stark schleimbildenden Stämme 1607 u. 1609, die derzeit von FISCHER isoliert waren, wurden damals nach Isolierung mit nur geringer und überhaupt keiner Schleimhautbildung vermerkt. Das alles unterstützt die Ansicht, daß sehr starke Schleimbildung als eine Art pathologische Degeneration auf Grund langjähriger, einseitiger Kulturdauer anzusehen ist.

Auch diese Bildung nichteiweißhaltiger Zellsubstanz bzw. Schleimes und damit auch der Ö. K. ist vom O_2 -Partialdruck abhängig; sie ist ähnlich wie die N-Bindung bei niedrigem P_{O_2} am höchsten und nimmt mit steigendem O_2 -Druck ab. Allerdings ist die N-Bindung vergleichsweise weit weniger als die Trockensubstanzbildung gehemmt oder umgekehrt ausgedrückt, die Förderung der Trockensubstanzbildung durch niedrige O_2 -Partialdrucke ist wesentlich größer als die der N-Bindung. Daraus ergeben sich bei geringem O_2 -Druck große Trockensubstanzmengen und hohe Ö. K. mit geringem Eiweißgehalt, bei hohen O_2 -Partialdrucken geringe Trockensubstanzbildung und Ö. K. mit höherem prozentualen Eiweißanteil (Tab. 2 u. 3).

Ebenso erfolgt stärkste Schleimbildung bei niedrigen O_2 -Drucken und Abnahme mit ansteigenden O_2 -Partialdrucken. Bei $P_{O_2} = 0,04$ Atm. wird fast ebensoviel Schleim wie Bakterienmasse gebildet, bei $P_{O_2} = 0,40$ Atm. nur 40% der Bakterienmasse (Tab. 5). Bei höheren Zuckerkonzentrationen über 1,5% kann die Schleimbildung sogar den doppelten bis

dreifachen Wert erreichen. Die Kulturlösung wird dann allerdings derart viscos, daß keine befriedigende Belüftung mehr möglich ist und die Versuche vor völligem Zuckerverbrauch abgebrochen werden mußten.

Es ist naheliegend, hieraus zu schließen, daß die Bildung von Schleim und anderen nichteiweißhaltigen Zellinhaltsstoffen lediglich von der Sauerstoffversorgung abhängig ist und durch partiellen O₂-Mangel gefördert wird, denn bei konstanter Belüftungsintensität wird nach starkem Zuwachs von Zellsubstanz gegen Ende des Wachstums sehr viel mehr O₂ verbraucht als zu Wachstumsbeginn, es wird also um so eher relativer O₂-Mangel eintreten, je niedriger der O₂-Partialdruck ist. Daß die Verhältnisse aber nicht so einfach liegen, zeigen die Versuche bei konstantem O₂-Druck, aber steigender Belüftungsintensität (Tab. 5). Hier wird gerade

Tabelle 5. Schleim- und Trockensubstanzbildung von *Azotobacter vinelandii* 1607 bei verschiedenen Belüftungsintensitäten und O₂-Partialdrucken

Po ₂ Atm.	Bakterien- trockensubstanz mg/ml	Schleimtrocken- substanz mg/ml	Schleim, Prozent der Bakterien- trockenmasse
0,008	0,60	0,86	142,0
0,04	3,22	3,15	98,0
0,21	2,92	1,70	58,4
0,40	1,95	0,77	39,6
Belüftungs- intensitäten (Luft) l/min/l			
0,125	2,1	0,67	32,0
0,25	2,62	1,10	42,0
0,5	2,92	1,70	58,4
1,00	3,44	2,22	64,6
3,0	3,58	2,52	70,5

Trockensubstanzbildung zum Zeitpunkt maximaler Schleimbildung nach vollständigem Glucoseverbrauch in 2—3 Parallelkulturen bestimmt.

umgekehrt bei stärkster Belüftung und damit bester O₂-Versorgung am meisten Schleim gebildet, und die Schleimbildung geht auch mit abnehmender Belüftungsintensität zurück. O₂-Mangel kann also nicht die Ursache sein. Auch der CO₂-Gehalt der Durchlüftungsgase hat im Gegensatz zu den Verhältnissen bei *Streptococcus bovis* (DAIN, NEAL u. SEELEY 1956) keinen Einfluß. Belüftungsversuche mit CO₂-Gehalten von 0,02 bis 3% zeigten keinerlei signifikante Unterschiede.

DUGUID u. WILKINSON (1948) heben hervor, daß die Schleimbildung nicht von bestimmten Einzelfaktoren abhängig ist, sondern daß sie immer dann einsetzt, wenn irgendeiner der wesentlichen Nährstoffe außer Kohlenhydraten bzw. der notwendigen Kulturbedingungen begrenzender Faktor für das Wachstum wird. Dies dürfte auch für die Bildung anderer nichteiweißhaltiger Zellinhaltsstoffe gelten. Wie

bereits von RADLER (1955) betont wurde, scheint bei *Azotobacter* bei gesteigerter Wachstumsgeschwindigkeit und Stoffwechselaktivität in Belüftungskulturen die N-Bindung begrenzender Faktor zu sein. Dafür spricht auch die Tatsache, daß starke Reservesubstanzbildung erst gegen Ende des Wachstums und nur bei Bindung von Luftstickstoff und kaum bei N-heterotropher Ernährung auftritt. Wenn die N-Bindung ins Minimum kommt, wird der Stoffwechsel in Richtung eines Kohlenhydratüberschuß- oder Nebenstoffwechsels im Sinne von FOSTER (1949) auf Reservestoffbildung umgeleitet. Wird daher bei gleichbleibendem P_{O_2} die Belüftungsintensität verstärkt, erfolgt bei gleichbleibender Höhe der N-Bindung eine Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit, es kommt dann die Geschwindigkeit der N-Bindung ins Minimum. Bei konstanter Belüftungsintensität und Änderung des O_2 -Partialdruckes nimmt bei zwar erhöhter, aber annähernd gleichbleibender Wachstumsgeschwindigkeit die Höhe der N-Bindung mit abnehmendem O_2 -Partialdruck zu. Höhere N-Bindung bedeutet aber eine mehr ökonomische Ausnutzung der C-Quelle. Bei stärker gehemmter N-Bindung bei hohen O_2 -Partialdrucken wird also mehr Glucose zur Bindung von N verbraucht und steht damit weniger für den Kohlenhydratnebenstoffwechsel zur Verfügung.

Unter Umständen ist bei höheren O_2 -Partialdrucken auch mit erhöhter Atmung zu rechnen. Auf eine bei anderen Bakterien bisher nicht bekannte Abhängigkeit der Atmung vom O_2 -Partialdruck bei *Azotobacter* wurde allerdings mit völlig gegenteiligen Befunden sowohl von MEYERHOF u. BURK (1928) als auch von FIFE (1943) hingewiesen. Nach direkter Bestimmung des gebildeten CO_2 und gleichzeitiger calorischer Messung in ständig belüfteter, wachsender Kultur kam FIFE zu dem Ergebnis, daß die Atmung bei niedrigsten O_2 -Partialdrucken am geringsten ist und fast proportional mit ansteigendem O_2 -Druck bis zu einem Maximum bei $P_{O_2} = 0,80$ Atm. zunimmt. MEYERHOF u. BURK (1928) fanden gerade umgekehrt bei Respirationsversuchen in der Warburg-Apparatur zwischen P_{O_2} 0,15 bis 0,21 Atm. die stärkste Atmung, die nach beiden Seiten schnell abnimmt. Nimmt man mit FIFE, dessen Versuchsanordnung in etwa der unsrigen entspricht, erhöhte Atmung mit steigendem O_2 -Partialdruck an, so läßt sich die verminderte Trockensubstanz- und Schleimausbeute auch durch verstärkte Veratmung der Kohlenstoffquelle erklären.

Schlußbetrachtungen

Bei Assimilation gebundenen Stickstoffs (Ammon-N), wobei die Bindung von Luftstickstoff sofort gehemmt wird, reagiert *Azotobacter* auf Verbesserung der O_2 -Versorgung, sei es durch Steigerung der Belüftungsintensität, sei es durch Erhöhung des O_2 -Partialdrucks, genauso wie die zum Vergleich herangezogenen, streng aeroben N-Heterotrophen *Serratia* und *Torula* mit gesteigerter Wachstumsgeschwindigkeit,

Trockensubstanz- und Eiweißbildung. Abgesehen von einer etwas stärkeren Wachstumshemmung bei sehr hohen O_2 -Partialdrucken kann *Azotobacter* bei N-heterotropher Ernährung also durchaus als aerober Organismus angesehen werden.

Aber auch bei Bindung von Luftstickstoff ist der aerobe Charakter nicht abzuspüren. Bessere Sauerstoffversorgung, gleichgültig ob durch Vergrößerung der Oberfläche oder Zusatz von Agar bei unbewegten Flüssigkeitskulturen oder durch direkte Belüftung und Steigerung der Belüftungsintensität hervorgerufen, bewirkt auch hier eine Steigerung von Wachstum, Zellzahl und Trockensubstanzausbeute. Klar hiervon zu trennen ist die Wirksamkeit oder Größe der N-Bindung, die definiert wird als die je Einheit verbrauchter C-Quelle fixierte Menge Stickstoff. *Die Höhe der N-Bindung ist unabhängig von der Sauerstoffversorgung.* Bei einer gegebenen Menge Glucose wird unter sonst gleichen Kulturbedingungen immer dieselbe Menge Stickstoff fixiert, bei guter O_2 -Versorgung und schnellem Wachstum in kürzerer Zeit, bei geringer O_2 -Versorgung und langsamem Wachstum in entsprechend längerer Zeit. Noch deutlicher als bei den Versuchen mit steigender Belüftung wird dies bei der von RADLER (1955; Abb. 8, S. 348) gegebenen Gegenüberstellung belüfteter und unbelüfteter Kulturen. Bei gleicher Glucoseanfangskonzentration wird in beiden Fällen im Endeffekt genau dieselbe Menge Stickstoff fixiert. Nur ist bei Belüftung die N-Bindung bereits nach 45 Std beendet, während das Wachstum bei unbelüfteten Kulturen fast 400 Std andauert. Bei schnellem Wachstum wird die restliche, nicht zur N-Bindung verbrauchte Glucose zum Aufbau von nichteiweißhaltiger Zellsubstanz, bei langsamem Wachstum vorwiegend im Betriebsstoffwechsel verbraucht.

Es kann nicht genug betont werden, daß die Höhe der N-Bindung (mg N/g Glucoseverbrauch) von der O_2 -Versorgung nicht beeinflußt wird. Wie bereits eingangs erwähnt, findet man immer wieder die Angabe, daß die N-Bindung durch Sauerstoff gefördert wird. Dies ist aber höchstens so zu verstehen, daß bei besserer O_2 -Versorgung in der Zeiteinheit mehr N gebunden wird, besagt dann aber nichts über die endgültige Höhe der N-Bindung. Die in diesem Zusammenhang von BURRIS u. WILSON (1947) aufgeworfene Frage kann also in dem Sinne beantwortet werden, daß verbesserte O_2 -Versorgung lediglich günstigere Energieversorgung bedeutet und keinerlei Beziehungen zum Mechanismus der N-Fixierung selbst bestehen.

Eindeutig dagegen ist die Höhe der N-Bindung bei konstanter Belüftungsintensität vom O_2 -Partialdruck abhängig. Im Gegensatz zu der Auffassung von BURK (1930) setzt, soweit man allein aus derartigen Wachstumsversuchen schließen kann, eine Wirkung des O_2 -Partialdruckes nur bei Bindung von Luftstickstoff ein. Bei Assimilation gebundenen

Stickstoffs ist keinerlei Effekt des O_2 -Partialdrucks nachweisbar. Entgegen früheren Befunden von WILSON u. FRED (1937) konnte später mit verbesserter Versuchsmethodik auch bei Knöllchenbakterien gezeigt werden (BOND 1950), daß hier ebenfalls der O_2 -Partialdruck nur auf die N-Fixierung und nicht auf die Assimilation gebundenen Stickstoffs einen Einfluß hat.

Da stärkste N-Bindung bei niedrigen O_2 -Partialdrucken erfolgt und mit zunehmendem O_2 -Partialdruck abnimmt oder gehemmt wird, kann es sich nicht um eine einfache Wirkung der Sauerstoffversorgung handeln, auch eine direkte enzymatische Hemmung oder toxische Wirkung des Sauerstoffs ist unwahrscheinlich. Vielmehr scheinen mittelbar die durch den O_2 -Partialdruck bedingten Änderungen der Milieu- und Kulturbedingungen für den Mechanismus der N-Fixierung eine Rolle zu spielen. Ein wesentlicher Hinweis dafür ist die gefundene Abhängigkeit der Dauer der Induktions- oder lag-Phase vom O_2 -Partialdruck. Die Frage nach der Ursache der lag-Phase während der Bakterienentwicklung ist vorläufig noch wenig geklärt. Neben der Bildung wachstumsnotwendiger Intermediärprodukte wie Glutaminsäure u. a. wird heute besonders der Einfluß des Redoxpotentials diskutiert (HEWITT 1950). Danach ist die lag-Phase dadurch bedingt, daß es durch an die Bakterienzelle selbst gebundene reduzierende Aktivitäten (STOLP 1955) zu einem Potentialabfall in der Kultur kommt und Wachstum erst dann einsetzen kann, wenn ein optimal niedriges Potential erreicht ist. Durch den O_2 -Partialdruck wird besonders bei Belüftungskulturen das Redoxpotential wesentlich beeinflusst, diese durch die Bakterien selbst verursachte optimale Potentialeinstellung entweder gefördert oder gehemmt. Ähnlich erklären auch LWOFF u. MONOD (1947) die bei Belüftung gefundene Verlängerung der lag-Phase damit, daß durch starke Belüftung die Einstellung des für die Synthese oder Stoffwechsel der wachstumsnotwendigen Glutaminsäure notwendigen Redoxpotentials verzögert wird. Mit Annahme einer derartigen Redoxpotentialwirkung finden auch die bisher nicht deutbaren Befunde von FEDEROW (1948) eine Erklärung, daß durch Ascorbinsäurezusatz in unbelüfteten Kulturen die Höhe der N-Bindung bis zu 35% gesteigert werden kann. Weitere Versuche mit Redoxpotentialmessungen bei verschiedenen O_2 -Partialdrucken, über die in Kürze gesondert berichtet werden wird, lassen den Schluß zu, daß entscheidender Faktor für die Höhe der N-Bindung vornehmlich nur das vom O_2 -Partialdruck beeinflusste Redoxpotential ist. Sichtbarster Ausdruck dafür im Wachstumsverlauf ist die Verzögerung der Induktions- oder lag-Phase.

Es erscheint auf Grund vorliegender Versuche nicht möglich, von einer ausgesprochenen Mikroaerophilie von *Azotobacter* im biologischen Sinne zu sprechen. Auch steht der Annahme einer Mikroaerophilie entgegen,

daß *Azotobacter* ein ausgeprägt oxydatives Atmungssystem besitzt und keinerlei unvollkommen oxydierte Stoffwechselprodukte bildet. Nach der von McBEE, LAMANNA u. WEEKS (1955) gegebenen Definition ist *Azotobacter* eindeutig als aerober Organismus mit oxybiontischem Stoffwechsel anzusprechen. Inwieweit die Abhängigkeit der N-Bindung vom O_2 -Partialdruck rein ökologisch von Bedeutung ist, scheint auf Grund der bisherigen Untersuchungen noch nicht absehbar.

Zusammenfassung

1. Bei *Serratia marcescens*, *Torula utilis*, *Azotobacter vinelandii* und drei physiologisch unterschiedlichen Stämmen von *Azotobacter chroococcum* wurde der Wachstumsverlauf bei verschiedenen Belüftungsbedingungen im Kluverkolben verfolgt.

2. Verbesserung der O_2 -Versorgung durch Steigerung der Belüftung oder Erhöhung des O_2 -Partialdruckes bewirkt bei *Serratia*, *Torula* und *Azotobacter* im Falle N-heterotropher Ernährung Steigerung von Wachstumsgeschwindigkeit, Trockensubstanzausbeute (Ö. K.) und Eiweißbildung.

3. Bei N-Fixierung werden bei *Azotobacter* durch verbesserte O_2 -Versorgung, z. B. bei Steigerung der Belüftung, ebenfalls Wachstumsgeschwindigkeit und Trockensubstanzbildung (Ö. K.) erhöht, aber die Höhe der N-Bindung bleibt unbeeinflusst und konstant. Der prozentuale Eiweißgehalt der Bakterienmasse nimmt mit zunehmender Belüftung ab, dafür werden vermehrt nichteiweißhaltige Reservesubstanzen gebildet.

4. In Belüftungskulturen liegt das Maximum der N-Bindung zu Beginn der lag-Phase. Mit zunehmendem Kulturalter nimmt die Höhe der N-Bindung ab.

5. Nur die N-Fixierung, nicht die Assimilation gebundenen Stickstoffs wird durch den O_2 -Partialdruck beeinflusst. Die N-Bindung ist bei niedrigen O_2 -Partialdrucken von 0,02—0,04 Atm. am größten (18—20 mg N/g Glucoseverbrauch) und nimmt mit ansteigendem O_2 -Partialdruck ab (P_{O_2} 0,21 Atm. = 13—14, P_{O_2} 0,40 Atm. = 10—11). Bei P_{O_2} = 0,60 Atm. sind Wachstum und N-Bindung völlig gehemmt.

6. Mit zunehmendem O_2 -Partialdruck wird bei gleichzeitig verminderter N-Bindung die Induktions- oder lag-Phase mehr und mehr verlängert. Diese ausschließlich vom O_2 -Partialdruck abhängige lag-Phasenverzögerung wird weder durch Alter und Menge des Impfmateri als noch durch CO_2 oder andere Kulturbedingungen beeinflusst.

7. Starke Bildung nichteiweißhaltiger Reservesubstanzen oder Schleim erfolgt unabhängig von der O_2 -Versorgung und scheint dadurch bestimmt zu sein, daß bei gesteigerter Wachstumsgeschwindigkeit in Belüftungskulturen die N-Bindung begrenzender Wachstumsfaktor wird.

8. Es wird angenommen und erörtert, daß es sich bei der Abhängigkeit der N-Bindung vom O₂-Partialdruck nicht um eine einfache Wirkung der O₂-Versorgung, direkte enzymatische Hemmung oder toxische Wirkung des Sauerstoffs handelt, sondern daß vielmehr die durch den O₂-Partialdruck bedingten Änderungen der Milieu- oder Kulturbedingungen für den Mechanismus der N-Bindung eine Rolle spielen. Die lag-Phasenverzögerung deutet auf einen Effekt des Redoxpotentials hin.

Ausgeführt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Frau D. SCHÖNBORN, geb. SCHWARZ, sei für ihre gewissenhafte Mitarbeit bei Durchführung der Versuche freundlichst gedankt.

Literatur

- ALEXANDER, M., and P. W. WILSON: *Appl. Microbiol.* **2**, 135 (1954).
 DE BECZE, G., u. A. J. LIEBMANN: *Ind. Chem.* **36**, 882 (1944). — BOND, G.: *Ann. Botany* **15**, 95 (1950). — BURK, D.: *J. Physic. Chem.* **34**, 1195 (1930). — BORTELS, H.: *Zbl. Bakter. II* **100**, 373 (1939). — BUKANTZ, S. C., A. COOPER and J. G. M. BULLOWA: *J. Bacter.* **42**, 29 (1941). — BURK, D., and H. LINEWEAVER: *J. Bacter.* **19**, 399 (1930).
 COOPER, E. A., and J. PRESTON: *J. Soc. chem. Ind.* **56**, 1 (1937).
 DAIN, J. A., A. L. NEAL and H. W. SEELEY: *J. Bacter.* **72**, 209 (1956). — DUGUID, Z. P., and I. L. WILKINSON: *J. of Path.* **60**, 265 (1948).
 FEDEROV, M. V.: *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* **66**, 945 (1948). — FIFE, J. M.: *J. agricul. Res.* **66**, 229 u. 421 (1943). — FINK, H.: *Biochem. Z.* **301**, 137 (1939). — FINK, H., u. I. LECHNER: *Biochem. Z.* **299**, 1 (1938). — FISCHER, W.: Beiträge zur Kenntnis der Biologie von *Azotobacter chroococcum* Beij. Diss. der math.-nat. Fakultät Göttingen 1946. — *Arch. Mikrobiol.* **14**, 353 (1950). — FOSTER, J. W.: *Chemical activities of Fungi*. New York 1949.
 HEWITT, L. F.: *Oxydation-Reduction Potentials in Bacteriology and Biochemistry* Edinburgh 1950.
 KAUFMANN, W.: *Arch. Mikrobiol.* **17**, 319 (1952).
 LWOFF, A., et J. MONOD: *Ann. Inst. Pasteur* **73**, 323 (1947).
 MCBEE, R. H., C. LAMANNA and O. B. WEEKS: *Bacter. Rev.* **19**, 45 (1955). — MEYERHOFF, O., u. D. BURK: *Z. physik. Chem.* **139**, 117 (1928).
 PARKER, C. A.: *Nature* **173**, 780 (1954).
 RADLER, F.: *Arch. Mikrobiol.* **22**, 335 (1955). — RIPPET, A.: *Arch. Mikrobiol.* **7**, 210 u. 590 (1936). — RIPPET, A., G. BEHR u. K. NABEL: *Arch. Mikrobiol.* **9**, 375 (1938).
 SINGH, K., P. N. AGARWAL and W. H. PETERSON: *Arch. of Biochem. a. Biophysics* **18**, 181 (1948). — SMITH, C. G., and M. G. JOHNSON: *J. Bacter.* **68**, 346 (1954). — STOLP, H.: *Arch. Mikrobiol.* **21**, 283 (1955).
 TSCHAPEK, M., e A. GARBOSKY: VI. Congresso internat. di Micr. **3**, 896 (1953) Roma. — TSCHAPEK, M., u. N. GIAMBIAGI: *Kolloid-Z.* **135**, 47 (1954). — *Arch. Mikrobiol.* **21**, 376 (1955).
 WILSON, P. W., and R. H. BURRIS: *Bacter. Rev.* **11**, 41 (1947). — WILSON, P. W., and E. B. FRED: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **23**, 503 (1937). — WILSON, J., and P. W. WILSON: *J. Bacter.* **41**, 141 (1941).
 ZELLER, N.: *Biochem. Z.* **300**, 215 (1938).

(From the Microbiology Department, St. Xavier's College, Bombay, India)

A Contribution to the Study of the Intestinal Microflora of Indian Earthworms

By

S. R. KHAMBATA ** and J. V. BHAT *

(Eingegangen am 6. Mai 1957)

A large amount of information on the beneficial activities of earthworms has accumulated. The rich chemical composition of casts as well as the burrowing and ploughing action of worms are well known, but there are few studies of the microflora in the intestinal tract of earthworms.

LOUIS PASTEUR isolated *Bacillus anthracis* from the intestine of the earthworm and ascribed to it the role of disseminating anthrax (DUBOS 1951). BASSALIK (1913a) isolated more than 50 species of bacteria from the alimentary canal of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. He found no difference between the types of bacteria isolated from the gizzard, intestine and casts and those present in the soil from which they were collected. BASSALIK (1913b) also reported the isolation of a red-pigmented, oxalate decomposing organism, *Bacillus extorquens*, from the excreta of an earthworm which had ingested plant material containing calcium oxalate. AICHBERGER (1914) observed that no diatoms, blue-green algae, desmids, yeasts or rhizopods were found alive in the alimentary canal of the worm. TAYLOR (1917) and RATHBUN (1918) considered earthworms as disseminating agents of spores of soil fungi like *Fusarium*. HEYMONS (1923) described the intestine of the worm as a breeding place for bacteria. DÜGGELI (1927) reported that earthworms play a part in spreading bacteria in deeper levels of the soil. According to DELAUNAY (1927) bacteria are responsible for the degradation of urea in the intestinal tract of earthworms. STÖCKLI (1928) found a larger number of microorganisms present in worm casts than in soil. THOMSON (1934) thought that bacteria in the soil are brought up to the surface in casts and visualised the possibility of the spread of the tetanus bacillus through this agency. GIANFERRARI and CANTONI (1936) found a microorganism, resembling the mucous capsulated bacteria and the semi-colon group, to be regularly present in *Lumbricus terrestris*. SMITH and CLARK (1938) isolated from the earthworm intestine a non-sporeforming, Gram-negative bacterium which displayed the interesting phenomenon of rotating colonies.

RUSSELL (1950) pointed out that the microflora present in the earthworm gut may bring about the breakdown of organic matter and thus make the casts richer in plant nutrients. He further stated that the earthworm intestine may be the site for lignin oxidation and humus formation. SWABY (1950) states that the intestinal bacteria of earthworms produce gums which cement the casts into waterstable aggregates. DAY (1950) found that the total number of bacteria, actinomycetes, and

* Present Address: Fermentation Technology Laboratory, Indian Institute of Science, Bangalore 3, India.

** Junior Scientific Officer, "Survey of Microflora of Soils", Indian Council of Agricultural Research Scheme.

fungi did not show any consistent increase or decrease in fresh casts of *L. terrestris* as compared to soil. He observed that, whilst passing through the earthworm intestine, nitrifying bacteria did not undergo any considerable increase or decrease in numbers; *Bacillus cereus* var. *mycoides*, however, underwent slight reduction in numbers, while *Serratia marcescens* was completely killed. TRACEY (1951) reported the existence of cellulase and chitinase in British earthworms and suggested the possibility of these enzymes being produced by microorganisms living in their intestines.

Information on the microorganisms associated with the Indian earthworm is even rarer. KELKAR (1949) seems to have been the only person who did some work in this connection. He observed that the number of bacteria, as seen on nutrient agar plates, was generally less in casts but that the nitrifying power of the casts was higher than that of the corresponding soils.

From this survey of literature it would appear that BASSALIK was the only investigator who made an elaborate attempt at isolation and study of the microflora associated with the alimentary canal of the European species of earthworms. In this paper is presented for the first time a report on the types of microorganisms isolated from the intestinal tract of common Indian earthworms with the help of the enrichment cultures, and to a limited extent routine culture methods.

Experimental

Adult worms, mostly *Pheretima* species, were collected from different localities in and around Bombay about 6 to 8 weeks after the beginning of the South West monsoons. Within a few hours the worms were used for the extraction of their intestinal contents (KHAMBATA and BHAT 1953a; KHAMBATA 1954). A suspension of these, separate for each worm, was made in tubes of sterile physiological saline. During the course of 4 monsoon seasons 60 earthworms were experimented upon. One ml. of the suspension of intestinal contents was used as the inoculum for the various enrichment culture media which were dispensed in 50 ml. amounts in 250 ml. Erlenmeyer flasks.

The enrichment media employed were: a) BHAT and BARKER's medium (1948) modified by the incorporation of 0.1 per cent yeast extract for oxalate decomposing microorganisms.—b) A cellulose medium for the enrichment of cellulose utilising microorganisms. (The medium was made up as follows: sodium nitrate 2.5 gm.; dipotassium phosphate 1.0 gm.; magnesium sulphate 1.0 gm.; ferrous sulphate 0.02 gm.; calcium sulphate 0.01 gm.; distilled water 1 litre; $p_H = 7$.)—c) ASHBY's mannitol nitrogen-free medium and SMITH's modification (1934) thereof (by substituting dextrin for mannitol as the carbon source), for nitrogen fixing microorganisms.—d) Ammonium sulphate medium for the enrichment of nitrosifying microorganisms.—e) Sodium nitrite medium for nitrifying microorganisms.—f) Asparagine medium (KHAMBATA and BHAT 1955b) for the isolation of asparagine utilising microorganisms.

The cellulose enrichment medium was the only one for which aerobic and anaerobic conditions were provided. These enrichments were set up in 30 ml. capacity, narrow-necked, glass stoppered bottles filled to the top. After experimenting with 22 worms, the anaerobic cellulose enrichments were discontinued as it was found that they yielded isolates which grew equally well under aerobic conditions.

The suspensions obtained from the earthworm intestines were also used for inoculating the 2 routine media employed in this investigation, viz., nutrient agar

and MACCONKEY's agar, the former for the isolation of heterotrophic microorganisms and the latter for the isolation of entero-bacteria. The enrichment and routine culture media were kept at room temperature (27°—30° C.).

After successful passage through the second and third enrichment, pure cultures were achieved by streaking on the corresponding agar media. In the case of cellulose enrichments nutrient agar with 1 per cent starch and CZAPEK's agar were used, the former for isolating bacteria and the latter for actinomycetes and moulds.

The nitrosifying and nitrifying enrichments did not produce any growth and hence solid media for their isolation were not used. These enrichments were abandoned after the preliminary stage of our studies on 22 earthworms. Likewise, the nitrogen-free enrichment media were replaced by the asparagine enrichment medium after using them for the first 22 earthworms.

The isolates obtained from the various enrichment media and from the routine nutrient agar medium were subjected to a detailed microbiological examination. For their characterisation and identification the methods and descriptions laid down by the Society of American Bacteriologists (1946), BREED et al. (1948), SMITH et al. (1952), SKINNER et al. (1947), WAKSMAN (1950), and SMITH (1946) were used. A few difficult soil fungi were identified by Dr. R. S. VASUDEVA, Head of the Division of Mycology and Plant Pathology, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, to whom the authors are indebted.

Results and Discussion

The microbiological examination of 60 earthworms resulted in the demonstration of a mixed heterogeneous microflora consisting of a total number of 343 isolates. They will be discussed in two sections, viz., *Bacteria* (+ *Actinomycetes*) and *Moulds*. The majority of the isolates fall in the first named group. The moulds were encountered only in nitrogen-free and cellulose enrichment media. The results recorded are summarised in Table 1.

Table 1. *Number and types of microorganisms obtained from different media*

I: number of earthworms examined. II: total number of isolates. III: Name and number of strains of each isolate.

Oxalate enrichment: I: 60. II: 18. III: 2 *Mycobacterium lacticola* (*M. smegmatis*). 3 *Streptomyces* sp. 6 *Pseudomonas oxalaticus*. 2 *Bact. oxalaticum*. 1 Coryneform soil bacterium. 1 *Vibrio* sp. 3 Unidentified bacteria (resembling *P. extorquens*).

Cellulose enrichment: I: 60. II: 124. III: 11 *Pseudomonas* sp. 5 *Cellulibrio* sp. 4 *Vibrio* sp. 1 *Escherichia coli*. 1 *Bacillus megaterium*. 3 *Micrococcus* sp. 14 Coryneform soil bacteria. 23 *Nocardia corallina*. 5 *Nocardia* sp. 21 *Streptomyces* sp. 12 *Aspergillus* sp. 7 *Fusarium* sp. 3 *Penicillium* sp. 1 *Acremonium* sp. 13 Unidentified cellulolytic soil fungi.

Nitrogen-free enrichment: I: 22. II: 30. III: 7 *Rhizobium*-like sp. 4 *Azotobacter chroococcum*. 3 Unidentified slime bacteria. 1 Unidentified bacterium. 1 *Gaffkya* sp. 2 *Streptomyces cellulosae*. 1 *Streptomyces* sp. 1 *Nocardia rubra*. 1 *Nocardia corallina*. 8 *Penicillium* sp. 2 *Aspergillus* sp.

Asparagine enrichment: I: 38. II: 42. III: 20 Coryneform soil bacteria. 16 *Bacillus megaterium*. 3 *Bacillus firmus*. 2 *Pseudomonas* sp. 1 *Streptomyces* sp.

Nitrosifying enrichment: I: 22. II: Nil. III: Nil.

Nitrifying enrichment: I: 22. II: Nil. III: Nil.

Nutrient agar: I: 60. II: 129. III: 29 *Bacillus cereus*. 7 *Bacillus cereus* var. *mycoides*. 31 *Bacillus megaterium*. 23 *Bacillus subtilis*. 13 *Bacillus firmus*. 7 *Bacillus circulans*. 1 Variant of *Bacillus circulans*. 11 *Gaffkya* sp. 4 Variant of *Micrococcus aurantiacus*. 1 *Micrococcus* sp. 2 *Pseudomonas* sp.

MacConkey's agar: I: 22. II: Nil. III: Nil.

Bacteria and Actinomycetes

Oxalate enrichment

18 isolates were obtained from oxalate enrichment media. At first sight the total number of isolates obtained from 60 worms seems low. However, in view of the toxic nature of oxalic acid and the relatively rare occurrence of microbial oxalate decomposers, 18 isolates is a good number. Moreover, most of the *Streptomyces* isolated from cellulose and other enrichments shared the property of oxalate decomposition (though in the presence of yeast extract only); but these are not included among the 18 isolates.

5 of the 18 isolates belonged to the Actinomycetales. Two strains of *Mycobacterium lacticola* (*M. smegmatis*) and 3 *Streptomyces* species were found. Oxalate decomposing ability of the *Mycobacteria* has been reported by KHAMBATA and BHAT (1955a). The *Streptomyces* too have been reported to decompose oxalate in the presence of yeast extract by the same authors (1954).

13 of the oxalate isolates belonged to the Eubacteriales. 6 of these are strains of *Pseudomonas oxalaticus* described by KHAMBATA and BHAT (1953a). Two more isolates are strains of yet another oxalate decomposer, *Bacterium oxalaticum*, also described by KHAMBATA and BHAT (1953b). Three strains of a polarly flagellated bacterium producing a red, non water-soluble pigment resembled BASSALIK's (1913b) *Bacillus extorquens*—now reisolated and reclassified as *Pseudomonas extorquens* by LUDMILA JANOTA (1956). Our strains may be placed in *Pseudomonas* for their polar flagellation. They showed however irregularities in morphology, and till a direct comparison with JANOTA's culture can be made we refrain from placing them in the *Pseudomonadaceae*. As yet a description of these isolates has not been published but their ability to decompose oxalate has been reported (KHAMBATA 1954, BHAT and KHAMBATA 1955). Further, a single isolate of a Gram-negative, slender, filamentous, sluggishly motile and polarly flagellated, rod-shaped organism occasionally displaying branching and oval, vacuolated unstained areas, was isolated. This isolate, like the *Streptomyces*, decomposed oxalate only in the presence of yeast extract. It appears to be related to the soil coryneform group of bacteria. Lastly, an oxalate decomposing

Vibrio was also encountered. This differed widely from BHAT and BARKER's *Vibrio oxaliticus* (1948) which is the only vibrio so far reported to be able to decompose oxalate. As only one isolation of the vibrio has been made and also of the coryneform (mentioned above), these cannot be claimed as new species (KHAMBATA 1954).

The capacity to decompose oxalate by the various isolates was evidenced by their ability to form clear zones or haloes when grown on calcium oxalate agar as also by permanganate titration.

Cellulose enrichment

All cellulose enrichment isolates were tested for their ability to utilise cellulose by the following methods:

1. The China-blue-rosolic acid-cellulose agar method of SANBORN (1926, 1927) modified by substituting ashless cellulose powder (Whatman) for cotton in the medium. This method did not give satisfactory results.

2. Filter paper strips partially submerged in test tubes or petri dishes containing a mineral solution were inoculated, and the growth on, or disintegration of, filter paper, if any, was noted. The mineral solution was the same as for the enrichment of these organisms. A simple mineral medium for aerobic cellulolytic bacteria (DUBOS 1928) was also used. The ability of bacteria to attack filter paper strips in 1 per cent peptone water was also tested.

3. The manganese dioxide decolouration method used by SÖHNGEN (1914) gave reliable results. The method consists in precipitating manganese dioxide on filter paper resulting in a brown colouring. A disc of such paper is moistened in a sterile mineral solution in a petri dish and inoculated. The acids produced during cellulose decomposition act on the manganese dioxide forming colourless manganese salts. The method is useful because white or colourless growths of bacteria on white filter paper are difficult to observe.

The cellulose enrichments yielded 39 bacteria and 49 actinomycetes. The aerobic enrichments resulted in the isolation of 6 *Pseudomonas* sp., 1 Gram positive tetrad, *Micrococcus* sp., producing a lemon yellow pigment, 1 *Bacillus megaterium*, 4 *Vibrio* sp., and 14 isolates of a lemon yellow pigmented coryneform soil bacterium. The anaerobic cultures provided 5 *Cellvibrio* sp., 1 *Escherichia coli*, 5 *Pseudomonas* sp., 1 orange pigmented *Micrococcus* sp., and a lemon yellow pigmented coccal tetrad. All the isolates obtained from anaerobic enrichments grew well under aerobic conditions and were therefore maintained and studied under aerobic conditions.

The tetrad from aerobic enrichments utilised cellulose well giving a fairly good lemon yellow pigmented growth on filter paper moistened with mineral solution. A similar observation of tetrads growing on filter paper was made previously in this laboratory by LOBO (1950).

That 11 pseudomonads were isolated from cellulose enrichments is not surprising inasmuch as LOBO (1950), working on the human intestinal microflora, had isolated a large number of pseudomonads from cellulose

enrichments. The pseudomonads isolated by us gave poor or no growth on filter paper when tested in pure cultures by various methods of assaying cellulolytic activity. Some of the isolates, however, utilised cellobiose well. A large number of *Pseudomonas* species connected with cellulose decomposition have been listed by SIU (1951). Pseudomonads have also been observed to be associated with deteriorating fish nets and cordage (FREITAS and BHAT 1954). It is therefore not surprising that pseudomonads have been found in recent years to be concerned in cellulose decomposition (UEDA et al. 1952). The fact that our isolates were obtained from cellulose enrichments and their ability to utilise cellobiose, together with the observations of other workers, indicates a certain role of *Pseudomonas* in cellulose decomposition.

The 5 *Cellvibrio* cultures exhibited cellulolytic activity when tested by the manganese dioxide decolouration method as indicated by the formation of large, white patches on the brown paper within 3 weeks. They failed to give any signs of growth on filter paper with mineral solution, but with peptone complete disintegration of the paper at the interface of liquid and air took place, even without agitation. Before disintegration a well defined pale yellow ring was seen on the filter paper at the interface. The strains could also utilise cellobiose, though only slightly. They resembled in several respects *Cellvibrio fulvus*.

Although PARR (1937) reported the capacity of members of the *Coli-Aerogenes* group to grow in cellulose containing environments, we do not attach any significance to the isolation of 1 single non-cellulolytic *E. coli* which, incidentally, was the only coliform organism to be isolated during our studies on the earthworm intestinal flora. Similarly, the chance finding of a single isolate of *Bac. megaterium*, in our opinion, is of no significance.

The 4 pale yellow *Vibrio* species could not utilise cellobiose in a mineral medium. They gave no growth in DUBOS' cellulose medium, nor did they attack filter paper in peptone water. By the manganese decolouration method, however, they showed cellulolytic activity by producing slight white coloured patches on the brown filter paper. The organisms were classified as vibrios because of their Gram negative, curved rodlike shape and polar flagellation; but motility was indistinct. Nutritionally, they resembled the coryneform soil bacteria obtained from the asparagine enrichments (KHAMBATA and BHAT 1955b).

Lastly, 14 strains of a polar flagellated, coryneform soil bacterium were obtained from the cellulose enrichments, but the ability to utilise cellulose was not demonstrable by any of the assay methods, although cellobiose in a mineral solution was slightly utilised. These isolates closely resembled the flagellated coryneform bacteria isolated from asparagine enrichment media (KHAMBATA and BHAT 1955b).

Of the 49 *Actinomycetes* isolated from cellulose enrichments, 28 belonged to the genus *Nocardia* and the remaining 21 to the *Streptomyces*. 23 of the nocardias were identified as *Nocardia corallina*. All the *N. corallina* isolates, when grown on ASHBY's nitrogen-free agar, showed the peculiar bipolar staining granules, thus confirming the authors' earlier observations in collaboration with VAKIL (1952).

The *N. corallina* strains did not reveal any cellulolytic activity but they did utilise fairly well cellobiose as a sole carbon source in a mineral solution. In spite of our failure to demonstrate cellulose decomposition, FREITAS and BHAT (1954) observed that *N. corallina* obtained from rotting fish nets utilised cellulose even in a mineral solution. In this connection it is worthwhile noting what SIU (1951) says: "It must be remembered that most of the tests for cellulolytic activity have been based on relatively pure cellulose as the sole source of carbon. Such tests may not detect those species of microorganisms which are not able to grow on cellulose without supplementary organic compounds." Again, SHRIKHANDE (1933) observed that *Mycobacterium agreste* (syn. *N. corallina*), when grown on straw, digested about 14 per cent in 24 days, nearly half of which was cellulose. Referring to this observation, SIU (1951) remarked that some of the microorganisms classified at present as non-cellulolytic may turn out to be cellulolytic on detailed nutritional studies involving growth supplements. With what has been said above regarding *N. corallina*, and bearing in mind its very frequent isolation from cellulose enrichments by us, it can be said that *N. corallina* seems to play some part in the degradation of cellulose in the earthworm intestinal tract, perhaps in association with other microbial inhabitants of the intestines.

5 more strains of an unidentified *Nocardia* sp. were isolated (from the anaerobic cellulose enrichments). They utilised cellobiose feebly, gave slight growth on filter paper moistened with mineral solution, but grew extremely well on filter paper strips in peptone water, especially near the surface of the liquid. On incubation for 60 days and subsequent agitation, the filter paper broke near the liquid-air interface.

Of the 21 *Streptomyces*, 2 were identified as *Str. cellulosa* or at least closely related to it. The others could not be identified. Most of the *Streptomyces* from earthworms (including those isolated from enrichments other than cellulose) utilised cellulose very well. Most of these also possess the property of oxalate decomposition in the presence of yeast extract as already reported by us (KHAMBATA and BHAT 1954).

All the *Streptomyces* collected during our investigations were tested for antibacterial activity with the agar cross streak method against *Bacillus subtilis*, *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* (F.D.A. 309), *Escherichia coli* var. *communior* (strain supplied by the King Edward Memorial Hospital, Bombay) and *Salmonella typhosa* (Felix, Ty 2). None showed

any activity whatsoever against *S. typhosa* or *E. coli*. 3 showed slight activity against *M. pyogenes*. 7 displayed slight activity against *Bac. subtilis*, while only 1 was fairly active against it. ROUTIEN and FINLAY (1952) also found that "earthworm guts were disappointingly devoid of interesting antagonists".

Nitrogen-free enrichment

A study of the intestinal contents of 22 earthworms resulted in the isolation of 16 *Bacteria* and 5 *Actinomycetes*.

Of the 16 *Bacteria*, 11 were obtained from ASHBY's mannitol nitrogen-free enrichments and 5 from the nitrogen-free dextrin enrichments. The former 11 isolates consisted of 4 *Rhizobium*-like organisms, 2 strains of *Azotobacter chroococcum*, 1 *Gaffkya* sp., 3 unidentified slime bacteria and 1 unidentified bacterium. The dextrin enrichment isolates consisted of 3 *Rhizobium*-like organisms and 2 strains of *Azotobacter chroococcum*. Nutritional experiments on some of the bacterial isolates revealed that they were able to utilise atmospheric nitrogen to a small degree.

Of the 5 *Actinomycetes* isolated, 2 *Nocardias* and 2 *Streptomyces* were from mannitol enrichments and only 1 *Streptomyces* from dextrin enrichment. The 2 *Nocardias* were identified as *N. rubra* and *N. corallina*. A description of these together with their morphological peculiarities on ASHBY's agar has been published elsewhere (VAKIL et al. 1952). The *Nocardias* were obtained during the preliminary investigations on 2 worms from the oesophagus and gizzard respectively.

One streptomycete each from the mannitol and dextrin enrichments was identified as *Str. cellulosa*. All the 3 streptomycetes from nitrogen-free enrichments were able to attack cellulose. Although frequent claims as to nitrogen fixation by actinomycetes have been made, we do not, just because they happened to be isolated from nitrogen-free media, claim nitrogen fixation by any of our actinomycetes. Symbiotic nitrogen fixing microorganisms have been reported to be associated with invertebrates (GROPENGISSER 1925, PIERANTONI 1935, PEKLO 1946, TÓTH 1946) other than earthworms. The present paper is the first to report on the isolation of nitrogen fixing organisms from the intestine of earthworms. This indicates the possibility of the earthworm contributing to soil fertility.

Nitrosifying and nitrifying enrichments

The nitrosifying and nitrifying enrichments did not yield any isolate on experimentation with 22 earthworms and hence were discontinued at a later stage. That no nitrifiers were found is rather surprising in view of the many reports on increased nitrification in earthworm bearing soils. Nevertheless, the observation of COHEN and LEWIS (1949) that a good proportion of the excreted matter from the worms is ammonia

suggests that bacteria having the ability to utilise ammonia are perhaps not present in the intestinal tract of earthworms.

Asparagine enrichment

As already mentioned, after working on 22 worms the nitrogen-free enrichments were replaced by setting up asparagine enrichment media for the remaining 38 worms. Of the 42 organisms isolated, only one was an actinomycete—a cellulolytic *Streptomyces* sp. The remaining 41 bacterial isolates were as follows: 16 cultures of *Bac. megaterium*, 3 of *Bac. firmus*, 2 *Pseudomonas* sp., and 20 strains of a Gram-variable, doubtfully motile, polar flagellated, occasionally branched, irregular, rod-shaped microorganism classified as soil coryneform bacterium. These flagellated coryneform bacteria have already been described in detail by KHAMBATA and BHAT (1955b). However, asparagine was not suitable as the sole carbon and nitrogen source for the coryneform isolates. With ammoniacal nitrogen as an additional nitrogen source the growth was better, and with the further addition of thiamine this was more marked, though the growth was still not profuse. The *Bac. megaterium* and *Pseudomonas* isolates utilised asparagine as the sole source of carbon and nitrogen extremely well though it served only partially for *Bac. firmus*. A striking observation was the frequent association of *Bac. megaterium* with the coryneform bacteria in asparagine enrichments as shown by the isolation of 16 strains of the former and 20 of the latter. The ability of *Bac. megaterium* to utilise asparagine so well may perhaps explain why the coryneforms were frequently isolated from asparagine enrichments even though they could not readily utilise asparagine.

Nutrient agar

In all, 129 bacteria were isolated from nutrient agar plates, 111 of which were sporeforming Bacilli, 11 were *Gaffkya* sp., 5 *Micrococcus* sp., and 2 *Pseudomonas* sp. 4 of the 5 Micrococci were starch hydrolysing variants of *Micrococcus aurantiacus*. Of the 111 Bacilli, 36 were *Bac. cereus* (7 of which were *Bac. cereus* var. *mycoides*), 31 *Bac. megaterium*, 23 isolates of the *Bac. subtilis* group, 13 isolates of the *Bac. firmus* group, and 8 isolates of *Bac. circulans*, one of which was a nonstarch hydrolysing variant similar to the ones described and illustrated by IYER and BHAT (1955). The 8 cultures of *Bac. circulans* exhibited the interesting phenomenon of migrating colonies on the surface of nutrient agar plates.

MacConkey's agar

No growth took place when earthworm intestinal contents were spread heavily on agar plates. For the spreading of human infections of the intestinal tract the earthworm presents no danger. Living as it does on

human and animal wastes, including dung heaps, one would suspect this creature to carry intestinal pathogens derived from human source. The fact that the earthworm does not appear to carry in its intestine even *E. coli* (except one strain isolated from cellulose enrichment) may suggest that the intestinal secretions of this animal, and perhaps the oxalates present therein, are the factors preventing the growth and survival of pathogenic bacteria.

Moulds

Nitrogen-free enrichment

From ASHBY's mannitol enrichments 4 *Penicillia* were obtained, while the dextrin enrichment yielded 4 *Penicillia* and 2 *Aspergilli*. As in the case of *Actinomycetes*, we do not claim any nitrogen fixation by these fungi just because they were isolated from nitrogen-free enrichments. The 2 *Aspergilli* did not attack cellulose, but the *Penicillia* utilised cellulose fairly well.

Cellulose enrichment

The only other enrichment to yield moulds was the cellulose enrichment. Thirty six moulds were isolated from 60 worms. They were: 7 *Fusarium* sp., 3 *Penicillium* sp., 12 *Aspergillus* sp., 1 *Acremonium* sp., and 13 unidentified soil fungi. Most of the isolates utilised cellulose in a mineral solution very well.

It is a well known fact that many moulds, including species of *Penicillium* and *Aspergillus*, possess the property of decomposing cellulose (SCALES 1915). *Acremonium* and *Fusarium* show also moderate to strong cellulolytic activity (SIU 1951). The moulds in the earthworm intestine play an important part in the decomposition of complex organic materials and thus contribute to the general fertility of the soil. However, there is one disturbing feature and this pertains to the isolation of cellulolytic, but at the same time strongly plant pathogenic, *Fusarium* species. This corroborates to a certain extent the observations made by TAYLOR (1917) and RATHBUN (1918) who ascribed the distribution of spores of soil fungi, like *Fusarium*, to earthworms. This would suggest the possibility of earthworms contributing phytopathogenic bacteria to the soil as well.

Concluding Remarks

Quite a number of common microorganisms (e.g. *Pseudomonas*, coryneform bacteria, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Bacillus*) live in the intestinal tract of the Indian earthworm as its normal flora. The isolates referred to in this paper have been described in detail in a doctoral dissertation (KHAMBATA 1954). We have only been able to demonstrate a fragment of this unexplored field. We have restricted the enrichments to a few

substrates and very likely more members of the normal flora could be found by employing other substrates, such as starch, glucose, succinate, formate, acetate, as also other metabolites which the earthworm consumes in the course of its life activities.

Summary

1. The literature on the microorganisms in the intestine of earthworms is reviewed in the introduction.

2. Our methods for the isolation of various types of microorganisms are described.

3. The microbiological examination of 60 Indian earthworms mostly by enrichment culture methods resulted in the demonstration of a mixed microflora as represented by our 343 isolates. Their physiological activities, such as oxalate decomposition, cellulose decomposition, nitrogen fixation and asparagine utilisation, are described and their implication in soil fertility pointed out. Some frequently occurring types like *Pseudomonas*, coryneform Bacteria, *Nocardias*, *Streptomyces* and sporeforming Bacilli compose the normal flora.

4. Nitrosifying and nitrifying bacteria do not appear to be associated with the earthworm intestine. No coliform bacteria of significance from the public health point of view seem to be associated with the earthworm.

5. The isolation of the cellulolytic, but at the same time plant pathogenic, *Fusaria* presents a problem in judging the practical value of the earthworms.

6. The results suggest the earthworms to be important agents contributing to soil fertility.

References

- AICHBERGER, R. VON: *Die Kleinwelt*. Z. Dtsch. Mikrol. Gesell. **6**, 53, 69 (1914).
 BASSALIK, K.: Z. Gärungsphysiol. **2**, 1 (1913a). — Jb. Bot. **53**, 255 (1913b). —
 BHAT, J. V., and H. A. BARKER: J. Bacter. **55**, 359 (1948). — BHAT, J. V., and
 S. R. KHAMBATA: Soc. Biol. Chem., India, Silver Jubilee Souvenir, 186 (1955). —
 BREED, R. S., E. G. D. MURRAY and A. P. HITCHENS: *BERGEY'S Manual of determinative Bacteriology*, 6th ed. Baltimore, Md.: Williams & Wilkins Co., 1948.
 COHEN, S., and H. B. LEWIS: *Federat. Proc.* **8**, 191 (1949).
 DAY, G. M.: *Soil Sci.* **69**, 175 (1950). — DELAUNAY, H.: *Recherches biochimiques sur l'excretion azotée des invertébrés*. Bordeaux: Thesis 1927. — DUBOS, R. J.: J. Bacter. **15**, 223 (1928). — Louis Pasteur, Free Lance of Science. London: Victor Gollancz Ltd. 1951. — DÜGGELL, M.: *Ber. schweiz. bot. Ges.* **36**, 24 (1927).
 FREITAS, Y. M., and J. V. BHAT: J. Univ. Bombay **23** (3 B), 53 (1954).
 GIANFERRARI, L., and G. CANTONI: *Boll. Ist. sieroter. Milan.* **15**, 369 (1936). —
 GROPENGIESSER, C.: *Zbl. Bakter. II Orig.* **64**, 495 (1925).
 HEYMONS, R.: *Z. Pflanzenernährg* **2** (A), 97 (1923).
 IYER, V., and J. V. BHAT: *Arch. Mikrobiol.* **23**, 88 (1955).
 JANOTA, L.: *Acta Societatis Botanicorum Poloniae.* **25**, 73 (1956).
 KELKAR, B. V.: Study of nitrification and other processes brought about by Earthworms in soils and effect of Earthworms on fertility of the soils. M.Sc. thesis,

Univ. of Bombay (1949). — KHAMBATA, S. R.: Studies on some microorganisms associated with the intestine of the Indian Earthworm. Ph.D. thesis, Univ. of Bombay (1954). — KHAMBATA, S. R., and J. V. BHAT: *J. Bacter.* **66**, 505 (1953a). — *Proc. Indian Acad. Sci. Sect. B* **38**, 157 (1953b). — *Nature (Lond.)* **174**, 696 (1954). — *J. Bacter.* **69**, 227 (1955a). — *Arch. Mikrobiol.* **22**, 175 (1955b).

LOBO, F. X.: Microorganisms of the intestinal tract as revealed by the enrichment culture method. M.Sc. thesis, Univ. of Bombay (1950).

PARR, L. W.: *J. Inf. Dis.* **60**, 291 (1937). — PEKLO, J.: *Nature (Lond.)* **158**, 795 (1946). — PIERANTONI, U.: *Arch. Zool. ital.* **22**, 135 (1935).

RATHBUN, A. E.: *Phytopathology* **8**, 469 (1918). — ROUTIEN, J. B., and A. C. FINLAY: *Bacter. Rev.* **16**, 51 (1952). — RUSSELL, E. J.: *Soil conditions and plant growth*, 8th ed. Recast and rewritten by E. Walter Russell. London: Longmans, Green & Co 1950.

SANBORN, J. R.: *J. Bacter.* **12**, 343 (1926); **14**, 395 (1927). — SCALES, F. M.: *Bot. Gaz.* **60**, 149 (1915). — SHRIKHANDE, J. G.: *Biochemic. J.* **27**, 1563 (1933). — SIU, R. G. H.: *Microbial decomposition of cellulose*. New York: Reinhold Publishing Corp. 1951. — SKINNER, C. E., C. W. EMMONS and H. M. TSUCHIYA: *Henrici's Molds, Yeasts, and Actinomycetes*, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1947. — SMITH, G.: *An introduction to industrial Mycology*, 3rd ed. London: Edward Arnold & Co. Ltd. 1946. — SMITH, N. R.: *J. Bacter.* **27**, 54 (1934). — SMITH, N. R., and F. E. CLARK: *J. Bacter.* **35**, 59 (1938). — SMITH, N. R., R. E. GORDON and F. E. CLARK: *Aerobic sporeforming Bacteria*. U.S. Dept. of Agric., Agricultural Monograph No. **16** (1952). — Society of American Bacteriologists: *Manual of methods for pure culture study of Bacteria*. Biotech. Publications, Geneva, N.Y. (1946). — SÖHNGEN, N. L.: *Zbl. Bakter. II Orig.* **40**, 545 (1914). — STÖCKLI, A.: *Landw. Jb.* **42**, 1 (1928). — SWABY, R. J.: *J. Soil Sci.* **1**, 195 (1950).

TAYLOR, M. W.: *Phytopathology* **7**, 374 (1917). — THOMSON, J. A.: *Biology for everyman*. Vol. I. London: J. M. Dent & Sons, Ltd. 1934. — TÓTH, L.: *The biological fixation of atmospheric nitrogen*. Hungarian Museum of Natural Sciences, Budapest (1946). — TRACEY, M. V.: *Nature (Lond.)* **167**, 776 (1951).

UEDA, K., S. ISHIKAWA, T. ITAMI and T. ASAI: *J. Agric. Chem. Soc., Japan* **25** (10), 543 (1952); **26** (1), 35 (1952).

VAKIL, J. R., S. R. KHAMBATA and J. V. BHAT: *Proc. Indian Acad. Sci. Sect. B* **36**, 243 (1952).

WAKSMAN, S. A.: *The Actinomycetes*. The Chronica Botanica Co. Waltham, Mass. 1950.

(Aus dem Laboratorium für Protophytenkunde, Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Untersuchungen an *Microthamnion kützingianum* Naeg.

Von

HELMUT PRAUSER

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Juli 1957)

Den Ausführungen sei eine kurze Artcharakteristik vorangestellt, wie sie sich etwa zu Beginn der Arbeit bot: *Microthamnion kützingianum* ist eine in stehenden und langsam fließenden Gewässern mit einer Basalzelle auf Pflanzen oder Steinen fest-sitzende, oft abgerissen im Plankton vorkommende, grüne, verzweigte, weit-verbreitete Alge, die eine Höhe von über 1 cm erreichen kann, meist aber in viel kleineren Exemplaren gefunden wird. Die Zellen besitzen eine dünne Cellulosemembran und enthalten einen Zellkern, einen grünen, plattenförmigen, wandständigen Chromatophor und Öl in kleineren oder größeren Tropfen, aber keine Stärke. Die Fortpflanzung erfolgt durch birnen- bis spindelförmige Zoosporen, die mit Ausnahme der Basalzelle in allen Zellen zu je 4—30 gebildet werden können und einen grünen Chromatophor, einen orangeroten Augenfleck und zwei gleich- und körperlange Geißeln besitzen. Darstellungen von



Abb. 1. *Microthamnion kützingianum* Naeg.
Strictissimum-Form. 290mal

Thalli bzw. Thallusteilen von *M. kütz.* sind in der Literatur zu finden (s. u.). Abb. 1 zeigt eine sogenannte „*Strictissimum*-Form“ (s. u.).

Die Gattung *Microthamnion* ist mehrfach das Objekt von Beobachtungen gewesen. So gehörte *M. kütz.* zu den ersten Algen, mit denen ernährungsphysiologische Untersuchungen unternommen wurden (MOLISCH 1895). Die letzten und gründlichsten Untersuchungen (PÉTERFI 1933, 1937) sind offenbar nicht bekannt geworden. Auf sie hinzuweisen, ist eine der Aufgaben der vorliegenden Arbeit¹. Zum anderen soll versucht werden, einige immer noch strittige Fragen endgültig zu klären bzw. ihre Problematik zu erörtern.

¹ Leider war nur die Dissertation (1937) zu beschaffen.

Material und Kultur

Neben einem Material unbekannter Herkunft wurden zwei Stämme aus Gräben des Buntsandsteingebietes südöstlich von Jena in Kultur genommen. Die Algen wurden auf festen (0,5—2% Agar) und in flüssigen Substraten bei Tageslicht und Zimmertemperatur gezogen. Die Kombination der Nährsalze erfolgte nach BENECKE (Lösung b), PRINGSHEIM (Lösung für *Micrasterias*), DETMER u. BOURRELLY (L+C). Während im ersten Jahr der Kultur mit BENECKE b-Lösungen und -Agarböden gutes Wachstum und reichliche Zoosporenbildung erzielt wurden, zeigten sich allmählich PRINGSHEIM-Lösungen und -Böden überlegen. Schließlich ergaben BENECKE-Medien überhaupt kein Wachstum mehr und PRINGSHEIM-Substrate nur ein sehr spärliches. Die Kultur wurde mit DETMER-Lösungen und -Böden und zum Schluß mit BOURRELLY-L+C-Medien erfolgreich fortgesetzt. Zu diesem auffallenden Verhalten lassen sich mancherlei Spekulationen anstellen; eine exakte Begründung fehlt. Voraussetzung für physiologische Arbeiten war die Herstellung artreiner, pilz- und bakterienfreier Kulturen. Über zwei der angewendeten Verfahren sei kurz berichtet, weil sie sich als erfolgreich und verhältnismäßig einfach erwiesen und auch bei der Reinigung von anderen Objekten helfen können.

1. *Isolierung von Zoosporen, unbeweglichen Einzelzellen und jungen Thalli mit Hilfe einer besonderen Pipette am Mikromanipulator (Gleitmikromanipulator von Zeiss, Jena).* Die Pipetten werden aus weichem Glas (z.B. Thüringer Thermometerglas) mit einem inneren Mündungsdurchmesser von 25—60 μ gezogen, 4—5 cm von der Mündung entfernt in einem Winkel von etwa 130° gebogen und nahe am hinteren Ende mit einem etwa 4 cm langen, lockeren Schlauchüberzug versehen, der zu ihrer Festlegung im Nadelhalterbett mittels der Klemmschrauben dient. Nach Lockerung einer Klemmschraube kann die Pipette mühelos vor und zurück bewegt werden, was bei Isolierungen aus größeren Gefäßen von Vorteil ist. Beim Eintauchen der Mündung in Flüssigkeit wird diese capillar in die enge Spitze eingesaugt. Dieser Sog wird zum Aufnehmen des Objektes in die Pipette benutzt. Druck liefert ein Aquarienbelüfter (z. B. „Hima-Neptun“), der nach dem Prinzip einer Membranpumpe arbeitet und eine Schraube zum Regulieren des Luftstromes hat. Der Ansatzstutzen des Gerätes wird mit einem dünnen Schlauch mit der Pipette verbunden und der Apparat so gestellt, daß die Schraube mit der linken Hand bequem zu bedienen ist, während die rechte am Trieb des Mikromanipulators liegt. Die Isolierung kann aus Lösungen und von Agaroberflächen, die stets einen Flüssigkeitsfilm tragen, erfolgen. Je weniger Lösung mit dem Objekt übertragen wird, um so geringer ist die Gefahr der Verunreinigung durch Fremdorganismen.

Im einzelnen geht die Isolierung folgendermaßen vor sich: Die Mündung der sterilen Pipette wird in einen Tropfen steriler Lösung getaucht, von der eine Spur capillar eindringt. Mit dem Belüfter wird leichter Druck erzeugt, dessen Größe an der Geschwindigkeit zu erkennen ist, mit der die Höhe der Flüssigkeitssäule in der Pipettenspitze abnimmt. Mit der Schraube läßt sich jede erforderliche Geschwindigkeit einstellen, auch Stillstand, der notwendig ist, wenn die Lösung je nach Wunsch bis auf einen oder wenige Millimeter aus der Pipette herausgedrückt ist. In diesem Zustand wird die Pipettenspitze unmittelbar an das Objekt gebracht und der Druck

vorübergehend ein wenig verringert. Das Objekt tritt dabei langsam ein und kann nach Abheben der Pipette in umgekehrter Weise mit einer sehr kleinen Flüssigkeitsmenge auf ein anderes Substrat überimpft werden. Es können auch mehrere Individuen auf einmal in die Pipette aufgenommen und dann einzeln verteilt werden. Wenn erforderlich, müssen die Objekte vor Übertragung auf das neue Medium in steriler Lösung gewaschen werden.

Besonders bei Algen tragen unter ungünstigen Voraussetzungen zuweilen schon jüngste Stadien in bzw. an ihren oft kaum wahrnehmbaren Gallerthüllen Bakterien, so daß deren mechanische Abtrennung sehr schwierig werden kann. Deshalb wurde eine andere Möglichkeit gesucht.

2. *Erzielung bakterienfreier Algenkulturen mit Hilfe von Antibiotica.* Als erstes Antibioticum wurde Penicillin in Konzentrationen von 10, 50, 100 IE/ml angewendet. Die Ergebnisse waren negativ. Ein Versuch mit Aureomycin lief auf folgenden Böden: 1. BENECKE b-Agar (= Bb-Ag) zur Kontrolle; 2. Bb-Ag + 0,2% Glucose als Kontrolle mit gefördertem Bakterienwachstum; 3. Bb-Ag + 3 γ Aureomycin/ml; 4. Bb-Ag + 15 γ Aureomycin/ml; 5. Bb-Ag + 30 γ Aureomycin/ml; 6. Bb-Ag + 15 γ Aureomycin/ml + 0,2% Glucose. Kontrolliert wurde nach 4 und 14 Tagen.

Bei den Konzentrationen von 15 und 30 γ /ml war Bakterienwachstum zwar vorhanden, aber deutlich gehemmt. Auch auf den 3 γ /ml enthaltenden Böden fanden sich Bezirke mit nur wenigen Kolonien. Am 14. Tage waren die Algen auf Bb-Ag und den aureomycinhaltigen Böden, außer auf dem Agar Nr. 5, noch am Leben, während sie auf den 0,2% Glucosesubstraten von Bakterien überwachsen und abgestorben waren. — Von einer Kultur auf Bb-Ag + 3 γ Aureomycin/ml wurde Material in 2, 20, 100, 200 γ /ml actinomycinhaltige Bb-Fleischwasserlösung übertragen. Während sich in den ersten Lösungen Bakterienwachstum durch Trübungen anzeigte, konnte aus der ungetrübten vierten nach drei Tagen *Microthamnion* bakterienfrei auf Bb-Ag abgeimpft werden. Die Thalli begannen bereits nach 24 Std Schwärmer zu entlassen. In den actinomycinhaltigen Lösungen kam es nirgends zur Schwärmerbildung. Die Algen machten vielmehr den Eindruck des Absterbens. Gleichzeitig gelang es, durch mehrfache Übertragungen mit dem Mikromanipulator von einer 3 γ /ml Aureomycin enthaltenden Platte bakterienfreie Kulturen zu erhalten. In diesem Falle waren durch das Antibioticum günstigere Voraussetzungen zur mechanischen Isolierung geschaffen worden, während durch das Actinomycin die Bakterien vollständig ausgeschaltet wurden.

Es sind Anzeichen dafür vorhanden, daß auch andere Algen weniger empfindlich gegen Antibiotica sind als die begleitenden Bakterien. Das Verfahren könnte dann vor allem für mehrzellige Formen die Erzielung bakterienfreier Algenkulturen erleichtern. Selbstverständlich wird der Erfolg von der Art der die Algen begleitenden Bakterienflora abhängig sein.

In allen Fällen wurde während oder nach der Anwendung der Antibiotica (auch in absoluten Algenreinkulturen) eine Zunahme der Schwärmerbildung beobachtet. Dies dürfte nicht auf einen spezifischen Einfluß des jeweiligen Antibioticums zurückzuführen sein, sondern vielmehr auf eine „Änderung des Milieus“, die ja häufig von solchen Organismen in gleicher Weise beantwortet wird.

Variabilität der Zellgrößen und die Konsequenzen für die Artsystematik

Die Durchsicht der Literatur zur Artsystematik der Gattung *Microthamnion* ergibt ein sehr verwirrendes Bild. Aber es ist hier nicht der Ort, die Geschichte des Wandels der systematischen Auffassungen darzulegen. Beschrieben wurden insgesamt 7 Arten. Ein Teil der Diagnosen

beruht auf der Untersuchung von fixiertem Material oder solchem, das nach Trocknung wieder aufgeweicht wurde, was bei einem so zarten Gebilde fast immer zu Veränderungen vieler zur Unterscheidung benutzten Merkmale führt. Fünf Arten wurden nur oder fast ausschließlich von ihren Autoren gefunden. Zwei Arten werden in der Literatur immer wieder genannt und kommen auch in Europa vor: *Microthamnion kützingianum* Naeg. und *Microthamnion strictissimum* Rabenh. Bereits HANS-GIRG (1886) betrachtete die letztere als Varietät von *Microthamnion kützingianum*. RAYSS (1929) kommt zum gleichen Schluß. Aber seine Ergebnisse sind wenig überzeugend, weil er Agarböden mit sehr hohen Konzentrationen an organischen Substanzen benutzte, wie sie am Standort auch nicht annähernd vorkommen. Die erzielten *Strictissimum*-Formen machen einen krankhaften Eindruck, was sich zahlenmäßig in den recht unterschiedlichen Dimensionen der Zellen eines Thallus widerspiegelt. Erst PÉTERFI (1937) hat im Experiment die vielfältige Bedingtheit der äußeren Gestalt erfaßt und sagt: „Die beiden Arten *Microthamnion kützingianum* Naeg. und *Microthamnion strictissimum* Rabenh. sind ökologische Formen ein und derselben Art.“ Beide Autoren erkannten im Zelldurchmesser (= Dm) und im Verhältnis von Zelllänge zum Zelldurchmesser (= L/D-V) die einzigen exakt faßbaren Merkmale zur Unterscheidung der Arten bzw. Formen der Gattung. Es ist leicht einzusehen, daß andere Erscheinungen wie Thallusgröße, dichte oder lockere Verzweigung, abstehende oder anliegende Zweige und Erkennbarkeit des Hauptstammes auf fortgeschrittenen Stadien — alles Merkmale, die zur Unterscheidung der beiden Arten herangezogen wurden (z. B. SCHMIDLE 1899) — sich aus den unterschiedlichen Zelldimensionen ergeben. Und da diese Verhältnisse variabel sind, nimmt es nicht wunder, daß die Trennung von *Microthamnion kützingianum* und *Microthamnion strictissimum* oft so schwer gefallen ist.

In einer Reihe von Arbeiten lassen die Autoren ganz unterschiedliche Auffassungen „typischer“ Thalli von *Microthamnion kützingianum* erkennen (RABENHORST 1868, SCHMIDLE 1899, HAZEN in PRINTZ 1927, CHODAT 1902, COLLINS 1909, GREGER 1915, RAYSS 1929, WEST in FRITSCH 1948). SMITH (1938) bildet nebeneinander einen Zweig von *Microthamnion kützingianum* und einen solchen von *Microthamnion strictissimum* ab, ohne daß sich ein bemerkenswerter Unterschied finden ließe. Auch die eigenen Versuche ergaben die Möglichkeit der Umwandlung von *Kützingianum*- in *Strictissimum*-Formen und umgekehrt (Abb. 1). Es liegt offenbar eine ähnliche Veränderlichkeit vor, wie sie PASCHER (1939) für *Heterococcus caespitosus* Vischer nachgewiesen hat. Nach dem gegenwärtigen Stand der Kenntnisse scheint es daher gerechtfertigt und notwendig, die *Kützingianum*- und *Strictissimum*-Formen als Grenzformen einer Art — *Microthamnion kützingianum* Naeg. — zu betrachten. In die

folgende Zusammenstellung sind auch die beiden anderen, heute noch anerkannten (RAYSS 1929, BEGER 1954), offenbar sehr seltenen, außer-europäischen Arten der Gattung aufgenommen.

Art	L/D-V	Dm
<i>Microthamnion kützingianum</i> Naeg.	2 :1 bis 8:1	2,6 bis 5,0 μ
<i>Microthamnion exiguum</i> Reinsch.	1,5:1 bis 2:1	1,5 bis 2,5 μ
<i>Microthamnion curvatum</i> West	9 :1 bis 12:1	1,6 bis 2,2 μ

Microthamnion exiguum könnte danach als eine kleinere, *Microthamnion curvatum* als eine gestrecktere Varietät von *Microthamnion kützingianum* aufgefaßt werden. *Microthamnion curvatum* besitzt ferner gekrümmte Endzellen, wie sie in seltenen Fällen auch bei *Microthamnion kützingianum*, allerdings nur in Kulturen, beobachtet wurden.

Sexuelle Fortpflanzung

Mit Ausnahme von PÉTERFI haben alle Autoren und auch ich keine Anhaltspunkte für sexuelle Fortpflanzung gefunden. PÉTERFI faßt alle Planogonidangien als Gametangien auf und gibt an, daß je 2—5 Gameten vor oder nach dem Verlassen der Gametangien zu Gametosporen (Zygoten) verschmelzen, die nach dem Festsetzen ohne Ruhestadium direkt zu je einem neuen Thallus auskeimen. Andererseits können sich Gameten ein und desselben Gametangiums auch als Parthenosporen verhalten, die in gleicher Weise zu neuen Thalli heranwachsen. Über den Ort der Reduktionsteilung sagt PÉTERFI nichts. Daß sich Schwärmer eines Gonidangiums teils als Gameten, teils als Zoosporen (Parthenosporen) verhalten können, ist eine häufige Erscheinung, die von einem geringen Grad der Differenzierung zeugt und als ein Merkmal gewertet wird, das für eine gewisse Ursprünglichkeit der betreffenden Art spricht. Schon aus diesem Grunde ist es unwahrscheinlich, daß hier die Reduktionsteilung bei der Zygotenkeimung unter Degeneration dreier Kerne verläuft. So bleibt nur übrig, die aus einer Zygote hervorgehenden Thalli als Diplonten, die aus den Parthenosporen entstehenden als Haplonten aufzufassen. Die Reduktionsteilung fände in den Gametangien auf den Diplonten statt. Andererseits treten nach PÉTERFI unter bestimmten Bedingungen Aplanosporangien und Aplanosporen auf, die er mit PRINTZ als reduzierte Zoosporen betrachtet. Da in meinen Stämmen geschlechtliche Fortpflanzung nicht beobachtet wurde, konnte ich all diesen Fragen nicht nachgehen. Das von mir untersuchte Material ließe sich unter dem Blickwinkel PÉTERFIS noch am einfachsten als haploides auffassen, das die Fähigkeit zur Kopulation verloren hätte, obwohl die geprüften äußeren Bedingungen denen von PÉTERFI entsprachen. Abschließend sei auf das Vorkommen von Scheinkopulationen hingewiesen (RAYSS), die

auch in den eigenen Kulturen beobachtet werden konnten. Über den Entwicklungszyklus von *Microthamnion kützingianum* läßt sich an Hand der angeführten Befunde noch nichts Sicheres sagen.

Ergänzungen zur Cytologie

RAYSS machte auf Grund der Gestalt und des Verhaltens der Zoosporen, des Fehlens von Pyrenoiden und Stärke und wegen einiger anderer Erscheinungen den Vorschlag, die Gattung *Microthamnion* in die Gruppe der *Heterokonten* aufzunehmen. Neuerdings führt auch SKUJA (1956) die Gattung in dieser Klasse auf. Obwohl nur wenige Objekte erschöpfend



Abb. 2. Zoospore im Stadium vor dem Festsetzen.
Etwa 3600 mal

untersucht sind, dürfen im Augenblick das Vorkommen einer pantonematischen Geißel — meist neben einer akronematischen — und das Fehlen von Chlorophyll b als abgrenzende Merkmale der *Heterokonten* gegen die *Chlorophyceen* gelten. Stärke fehlt den *Heterokonten* stets, den *Chlorophyceen* oft.

a) *Assimilations- und Speicherprodukte.* Öl läßt sich mit Sudan III in Schwärmern und jüngeren Zellen in Form kleiner Tröpfchen im peri-

pheren Plasma anfärben. Mit zunehmendem Alter, vor allem beim Absterben, kommt es zu großen, kugeligen Ansammlungen im Inneren. Vereinzelte Stärkekörner beschreiben nur RABENHORST (1868) und COOKE (1884). Alle anderen Autoren betonen das Fehlen von Stärke. Im vorliegenden Material ließen sich Ansammlungen von großen Stärkekörnern neben mikroskopisch fast diffus verteilt erscheinender Stärke in älteren Thalli mit Jodjodkalium nachweisen.

b) *Pigmente.* Die Untersuchungen von Algenpigmenten werden häufig durch zu kleine Materialmengen behindert oder unmöglich gemacht. Deshalb wurde die papierchromatographische Trennung der Pigmente versucht. Sie mißlang nach den Methoden von ASAMI (1952), BAUER (1952) sowie LIND, LANE u. GLEASON (1953). Die Arbeiten von MÁRKUS (1952) und HAGER (1955, 1957) waren zur Zeit der Untersuchung nicht zugänglich oder noch nicht erschienen. Schließlich führte ein einfaches Verfahren, über das in anderem Zusammenhang berichtet werden soll, zum Erfolg. Die Analyse ergab das Vorhandensein von Chlorophyll a und b, Carotin, Lutein und Violaxanthin.

c) *Begeißelung.* Lichtmikroskopisch wurden an den Schwärmern längstst zwei akrokonte, körperlange Geißeln gefunden. Es galt nun zu entscheiden,

ob beide Peitschengeißeln sind oder ob eine von ihnen Flimmern besitzt. Es wurde das Verfahren der Zielpräparation (SEIFERT u. ECKARDT 1955) angewendet. Abb. 2 zeigt zwei Geißeln des akronematischen Typs. Welcher Art die den Geißelenden seitlich anliegenden Gebilde sind, ist ungeklärt, hat aber in diesem Zusammenhang keine Bedeutung.

Systematische Schlußfolgerung

Auf Grund der isokonten Begeißelung, der Anwesenheit von Chlorophyll b und des Vorkommens von Stärke erweist sich *Microthamnion* ohne Zweifel als Chlorophyceae. Nach meiner Auffassung sollte die Gattung abweichend von FRITSCH (1948) zusammen mit *Lochmium* Printz, das weitgehend mit *Microthamnion* übereinstimmt, und *Thamniochaete* Gay, unter Ausschluß der Gattung *Rhaphidonema* Lagerheim, die weder sitzend, noch verzweigt ist, noch Zoosporenbildung zeigt, zu den *Erectae* innerhalb der Familie der *Chaetophoraceae* gestellt werden.

Zusammenfassung

1. Es wurde Material von *Microthamnion kützingianum* Naeg. dreier verschiedener Herkunft untersucht. Von einem der Stämme wurde mit Hilfe einer neuen Mikropipette und unter Anwendung von Antibioticis eine absolute Reinkultur hergestellt.

2. Die bisherigen Arten *Microthamnion kützingianum* Naeg. und *Microthamnion strictissimum* Rabenh. werden in Übereinstimmung mit PÉTERFI als Grenzformen der Art *Microthamnion kützingianum* Naeg. aufgefaßt.

3. Die von PÉTERFI beschriebene sexuelle Fortpflanzung konnte nicht beobachtet werden. Die Konsequenzen seiner Beobachtungen werden diskutiert.

4. Alle Zellen enthalten auf allen Stadien Öl. Stärke tritt in den Thalli von älteren Kulturen auf.

5. *Microthamnion* führt Chlorophyll a und b, Carotin, Lutein und Violaxanthin.

6. Die Zoosporen besitzen zwei gleich lange, apikal inserierte Peitschengeißeln mit gleichartiger Bewegung.

7. *Microthamnion* ist eine Chlorophyceae und sollte innerhalb der *Chaetophoraceae* mit *Lochmium* und *Thamniochaete* zur Gruppe der *Erectae* gezählt werden.

Herrn Prof. Dr. B. SCHUSSNIG danke ich für die vielseitigen Anregungen und Ratschläge zur Arbeit.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in der Forschungsstelle für Übermikroskopie der Friedrich-Schiller-Universität Jena gemacht. Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. ECKARDT und Herrn Dr. L. SEIFERT.

Literatur

ASAMI, M.: On the paper chromatography of the leaf pigments I. Bot. Mag. (Tokyo) **65**, 217 (1952).

BAUER, L.: Trennung der Karotinoide und Chlorophylle mit Hilfe der Papierchromatographie. Naturwissenschaften **39**, 88 (1952). — BEGER, H.: Chlorophyta. In ENGLER: Syllabus der Pflanzenfamilien, Bd. 1. Berlin 1954.

CHODAT, R.: Algues vertes de la Suisse. Bern 1902. — COLLINS, F. S.: The Green Algae of North America. Tufts college studies, Bd. 2, Massachusetts 1909. — COOKE, M. C.: British Fresh-Water Algae. London-Leipzig-New York 1882—84.

FRITSCH, F. E.: The structure and reproduction of the algae. Vol. 1, Cambridge 1948.

GREGER, J.: Beiträge zur Kenntnis der Entwicklung und Fortpflanzung der Gattung *Microthamnion* Naeg. Hedwigia **56**, 374 (1915).

HAGER, A.: Chloroplastenfarbstoffe, ihre papierchromatographische Trennung und ihre Veränderungen durch Außenfaktoren. Z. Naturforsch. **10b**, 310 (1955). — Zur Chromatographie der lipoidlöslichen Blattfarbstoffe. Planta (Berl.) **48**, 592 (1957). — HANSGIRG, A.: Prodromus der Algenflora von Böhmen. Prag 1886. — HODGKISS, W., J. LISTON, T. W. GOODWIN and M. JAMIKORN: The isolation and description of two marine micro-organisms with special reference to their pigment production. J. Gen. Microbiol. **11**, 438 (1954).

LIND, E. F., H. C. LANE and L. S. GLEASON: Partial separation of the plastid pigments by paper chromatography. Plant. Physiol. **28**, 325 (1953).

MÁRKUS, L.: Separation of plastid pigments by partition chromatography on paper. Agrochimia és Talajtan **1**, 291 (1952). — MOLISCH, H.: Die Ernährung der Algen. Sitzungsber. k. Akad. Wiss. Wien, Math.-nat. Cl. **104**, 1 (1895).

PASCHER, A.: Heterokonten. Rabenhorsts Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Bd. **11**, Leipzig 1939. — PÉTERFI, ST.: Sur la reproduction de *Microthamnion Kützingianum* Naeg. Bull. Soc. Sc. Cluj. **7**, 170 (1933). — Contributiuni la morfologia si fiziologia algei verzi *Microthamnion Kützingianum* Naeg. Contr. Bot. Cluj. **2**, H. 11 (1937). — Contributiuni la morfologia si fiziologia algei verzi *Microthamnion Kützingianum* Naeg. Teze prezentate facultatii de stiinta din Cluj. Cluj. 1937. — PRINTZ, H.: Chlorophyceae. In: ENGLER-PRANTL, Die natürlichen Pflanzenfamilien, Bd. **3**, Leipzig 1927.

RABENHORST, L.: Flora Europaea Algarum aquae dulcis et submarinae. Leipzig 1868. — RAYSS, T.: *Microthamnion Kützingianum* Naeg. Bull. Soc. Bot. Genève **21**, 143 (1929).

SCHMIDLE, W.: Einige Algen aus preußischen Hochmooren. Hedwigia **1899**, 165. — SCHUSSNIG, B.: Grundriß der Protophytologie. Jena 1954. — SEIFERT, L., u. A. ECKARDT: Eine einfache Methode zur Präparation lichtmikroskopisch ausgewählter Objektstellen für übermikroskopische Untersuchungen. Physikal. Verhandl. **6**, 15 (1955). — SKUJA, H.: Taxonomische und biologische Studien über das Phytoplankton schwedischer Binnengewässer. Uppsala 1956. — SMITH, G. M.: Algae and Fungi. Cryptogamic Botany, Bd. **1**, London 1938.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

Untersuchungen an farblosen und rhodomycinbildenden Stämmen von *Streptomyces purpurascens* Lindenbein

Von

HORST DÖLLE

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Juni 1957)

Die Erscheinung einer Degeneration bei Mikroorganismen, so auch bei *Streptomyces*-Arten — den bekannten Antibioticabildnern — gewinnt in letzter Zeit immer mehr an Bedeutung. Man versteht darunter vor allen Dingen einen Rückgang bzw. Verlust der Antibioticabildung im Laufe der Kultivierung.

So berichten WILLIAMS u. MCCOY (1953) von einem starken Nachlassen des Mycelwachstums und der Antibioticumbildung bei *Streptomyces griseus*. Mittels Hunger- und reichhaltiger Eiweiß-Nährböden versuchten sie, eine Regeneration zu ermöglichen. Dasselbe Problem tauchte bei *Streptomyces purpurascens* Lindenbein auf, dem Rhodomycinbildner. FROMMER (1955, 1956) konnte feststellen, daß die rhodomycinbildenden Stämme auf Nährböden mit Glycerin als C- und Glykokoll als N-Quelle plötzlich stark im Mycelwachstum und der Rhodomycinbildung nachließen. Hierbei kann es zum vollkommenen Verlust der Antibioticumbildung kommen, und der Stamm bleibt gänzlich farblos. Gute bzw. sehr gute Rhodomycin- ausbeuten wurden auf Nährböden mit Glycerin als C- und KNO_3 als N-Quelle gewonnen. Für die stark aktiven Rhodomycinbildner kam dieses auch in zunehmendem Maße für Glykokoll als N-Quelle in Frage. Die Rhodomycinbildung als solche bezeichnet FROMMER als Ergebnis eines luxurierenden Stoffwechsels im Sinne von PAECH (1950). Hiernach ist der Organismus unter den herrschenden Bedingungen nicht in der Lage, die gesamte Energie der Substrate auszunutzen. Es ist ihm somit leicht möglich, irgendwelche Nebenprodukte aufzubauen. Unter Umständen sollen diese Stämme Vorstufen der Rhodomycine, die in ihrem Stoffwechsel anfallen, bei Nahrungsmangel aber vollständig aufgebraucht werden, als Wasserstoff-Donatoren verwenden. Dabei sollen sie das Chinonsystem aufbauen und dasselbe als Oxydationsendprodukt ausscheiden. Bei den zu diesen Versuchen notwendigen Vorkulturen wurden die oben erwähnten farblosen Stämme auf Glycerin/Glykokoll-Nährboden erhalten. Letztere sollen auch weitaus stärker Säure bilden als diejenigen Stämme, die Rhodomycin ausscheiden. Es könnte somit auch möglich sein, daß bei diesen farblosen Stämmen unter den herrschenden Bedingungen die normale Atmung nicht mehr voll arbeitsfähig ist. Die Rhodomycinbildung wird nach FROMMER zur Energiegewinnung und/oder zur Entfernung anfallender Stoffwechselprodukte eingeschaltet. Im natürlichen Stoffwechsel der Streptomyceten finden bei der Bildung der Humusstoffe vermutlich ähnliche chemische Umsetzungen statt (RIPPEL-BALDES 1954; KÜSTER 1953/54). Hierbei werden die Wasserstoff-Donatoren jedoch von der Umgebung geliefert.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war ein möglichst eingehender stoffwechselphysiologischer Vergleich zwischen farblosen und rhodomycinbildenden Stämmen von *Streptomyces purpurascens* Lindenbein¹.

Methodik

1. Gewinnung von Vorkulturen: Alle vier untersuchten Stämme von *Streptomyces purpurascens* Lindenbein wurden nochmals als Einsporkulturen² isoliert und in Schrägröhrchen auf folgendem Nährboden kultiviert: 0,1 NaCl; 0,1 K_2HPO_4 ; 0,01 $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$; 0,01 $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$; 0,01 $CaCO_3$; 0,25 Glykokoll; 2,0 Glycerin; 2,0 Agar; 100 Wasser; pH 7,3.

Um eine möglichst gleichmäßige Beimpfung der Nährlösungen ohne Mycel und eventuell daranhaftenden Stoffwechselprodukten zu erhalten, wurden Sporensuspensionen in sterilem Aqua dest. hergestellt. Hierbei mußte das langsame Anwachsen und die oftmals auftretende Kugelbildung mit in Kauf genommen werden. Die Methode der Mycelbeimpfung (PFENNIG 1956), bei der die Kugelbildung nicht eintritt, konnte infolge der stoffwechselphysiologischen Untersuchungen nicht angewendet werden, da hierbei zu viel bereits vorhandene Stoffwechselprodukte mit eingeschleppt werden. Die Kultivierung erfolgte im Brutraum bei 28°C. Die Schüttelapparat hatte die Frequenz von 152 Hin- und Herbewegungen in der Minute.

2. Nährbodenzusammensetzungen für die Regenerationsversuche: Bei den Versuchen zur Regeneration wurden zwei verschiedene anorganische Nährstoffzusammensetzungen, als Basalmedium A und B bezeichnet, von folgender Zusammensetzung in 100 Wasser verwendet: Basalmedium A: NaCl 0,1; K_2HPO_4 0,1; $CaCO_3$ 0,01; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,01; $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,01. — Basalmedium B: NaCl 0,5; K_2HPO_4 0,2; $CaCl_2$ 0,04; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,1; $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,002; $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,001.

Als Kohlenstoff-Quelle wurden 2%, als Stickstoff-Quelle 0,25% der jeweils besonders angegebenen Substanz hinzugefügt. Weitere Zusätze von Salzen werden an den jeweiligen Stellen besonders aufgezeigt.

3. Atmungsmessungen an der Warburg-Apparatur: Sie wurden mit Hilfe der Warburg-Apparatur, Modell V der Firma B. Braun, Melsungen, durchgeführt. Als Manometer dienten Doppelcapillaranometer, als Gefäße wurden solche mit seitlichem Ansatz verwendet. Zur Herstellung der ruhenden Kulturen wurde das Mycel abzentrifugiert, mit Phosphatpuffer nach SÖRENSEN, der den gleichen pH-Wert der Kulturlösung hatte, mehrmals gewaschen, abermals zentrifugiert und das Mycel mit einer 1%igen sterilen Glycerinlösung aufgeschwemmt. Von dieser Aufschwemmung gelangten in jedes der dafür vorgesehenen Warburg-Gefäße 2 cm³. Der mittlere Zylinderraum wurde mit 0,2 cm³ einer 15%igen Kalilauge versetzt.

Bei den wachsenden Kulturen wurde genau so verfahren. Das abzentrifugierte Mycel wurde jetzt aber im ersten Zentrifugat aufgeschwemmt. Von letzterem gelangten dann 2 cm³ in die dafür vorgesehenen Warburg-Gefäße.

Das Zentrifugat wurde in ein steriles Kölbehen gegeben. Es zeigten sich niemals Hinweise dafür, daß infolge des Zentrifugierens unter nicht-sterilen Bedingungen eine an sich mögliche Bakterieninfektion eingetreten war, die das Ergebnis hätte beeinflussen können. Einzelne hineingelangte Keime konnten sich ja auch innerhalb der Versuchsdauer von 12—14 Std kaum bemerkbar machen.

¹ Für die Überlassung der untersuchten Stämme (S. 93) sei Herrn Prof. Dr. BROCKMANN bestens gedankt.

² Herrn Prof. Dr. R. MEYER danke ich für die freundliche Unterstützung bei den Einzell-Isolierungen.

Die Messungen mit der Warburg-Apparatur erfolgten bei der gleichen Temperatur wie im Brutraum (28° C).

4. Trockenmycelgewichtsbestimmung: Es wurden Filter der Firma Schleicher & Schüll Nr. 597 (\varnothing 9 cm), die vorher 24 Std im Exsiccator über Blaugel im Vacuum getrocknet und anschließend gewogen wurden, verwendet. Nach Abfiltrieren des Mycels wurde bei 105° C im Trockenschrank getrocknet, im Exsiccator abermals 24 Std über Blaugel im Vacuum stehen gelassen und dann gewogen.

5. Rhodomycinon-Bestimmung: Nach FROMMER (1955).

6. Glycerin-Bestimmung: Nach FROMMER (1955).

7. Bestimmung des Gesamtgewichtes der gebildeten Aldo- und Ketoverbindungen: Das Filtrat der entweißten Nährlösung wird stark eingengt und mit 70 cm³ 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung versetzt und ausgefällt. Die Lösung wird noch mehrfach eingengt und nach Erkalten filtriert. Verwendet wurden abermals Filter der Firma Schleicher & Schüll Nr. 597 (\varnothing 9 cm), die vorher 24 Std im Exsiccator über Blaugel im Vacuum getrocknet und anschließend gewogen wurden. Die Hydrazone wurden getrocknet, bis kein HCl-Geruch mehr auftrat, im Exsiccator über Blaugel 24 Std im Vacuum stehen gelassen und anschließend gewogen. Weiterhin wurde noch die Löslichkeit der Hydrazone in den geläufigen Lösungsmitteln untersucht [Vgl. auch HRUSCHKA (1957)].

8. Bestimmung der organischen Fettsäuren: 150 cm³ der Nährlösung werden mit einigen Kubikzentimetern 2 n HCl versetzt und in eine KUTSCHER-STEUDEL-Apparatur gebracht. Die darauffolgende Extraktion mit Äther ist ungefähr 24 Std auf einem Sandbad durchzuführen. Der Äther wird dann im Wasserbad abgedampft und der verbleibende Rest auf 15 cm³ mit Aqua dest. aufgefüllt. Die qualitative Bestimmung der einzelnen organischen Fettsäuren erfolgt mittels der Papierchromatographie. Als Lösungsmittel dienen: Für Essig-, Propion-, Butter-, Valerian-, Milch- und Capronsäure: n-Butanol: 1,5 n Ammoniak = 1:1. Sprühmittel: 0,04% Bromkresolgrün in einer Lösung Formalin: Äthanol = 1:5; mit 0,1 n NaOH auf p_H 5,0 bringen. Für Bernstein-, Citronen-, Äpfel-, Glutar-, Oxal- und Brenztraubensäure: n-Propanol: Ammoniak = 60:40. Sprühmittel: 0,1% Bromphenolrot in Äthanol; p_H etwa 7,0.

9. Bestimmung des Substrat-Eiweiß-Gehaltes: 100 cm³ des Kulturfiltrates werden mit 70 cm³ einer 5%igen Phosphorwolframsäure-Lösung versetzt und im Wasserbad auf ungefähr 70° C erhitzt. Nach dem Auflösen von 2—3 Plättchen NaOH wird mit conc. HCl stark angesäuert. Nach dem Erkalten wird filtriert. Verwendet wurden die bereits erwähnten Filter in derselben Anordnung.

10. Amid- und NH₄-Stickstoff-Bestimmung des Kulturfiltrates: Nach der Kjeldahl-Methode.

11. Bestimmung der Katalaseaktivität: Zu höchstens 50 cm³ einer 0,01 n H₂O₂-Lösung in 0,067 m Phosphatpuffer nach SÖRENSEN, p_H 6,8, und einer Temperatur von 0° C in einem Eisbad, werden 1 cm³ der zu untersuchenden Katalase-Lösung zugefügt, gemischt und zunächst 5 cm³ in 5 cm³ einer 2 n H₂SO₄ pipettiert. In Intervallen werden aliquote Teile in 2 n H₂SO₄ pipettiert. Jede Probe wird mit 0,01 n KMnO₄-Lösung bis zum Umschlagspunkt titriert. 1 cm³ 0,01 n KMnO₄ entspricht 0,17 mg H₂O₂. Die Katalaseaktivität wurde folgendermaßen berechnet:

$$K = \frac{\text{H}_2\text{O}_2\text{-Verbrauch in 30 Min (mg)} - \text{Blindwert}}{\text{mg Trockensubstanz}}$$

12. Phenoloxydase-Bestimmung: Nach KÜSTER (1953/54).

13. Gewinnung der freien Aminosäuren aus dem Kulturfiltrat: Nach PFENNIG (1956).

14. Gewinnung kupferfreier Nährböden: Nach SPICHER (1955).

15. Cytochrom-Bestimmung: 11 Tage alte Schüttelkulturen vom Stamm *M 2a* und *P 2a* wurden abzentrifugiert und 3—4mal mit der folgenden Lösung (SMITH 1955) gewaschen: 1,5 g Na_2HPO_4 ; 0,75 g KH_2PO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,05 g NaCl ; 1,0 l Aqua dest. Im Anschluß daran kam das Mycel mit möglichst wenig Flüssigkeit in kleine Erlenmeyer-Kölbchen, in die zur Verdrängung des Sauerstoffes Stickstoff eingeleitet wurde, der vorher noch durch drei große mit 12 Teilen 20%iger Sodalösung und 8 Teilen 20%igem Pyrogallol gefüllte Waschflaschen geleitet war. Das so vorbereitete Mycel wurde sodann 25 min ultrabeschallt. Die dadurch in Lösung gehenden wasserlöslichen Cytochrome wurden vom Mycel abzentrifugiert und im DU-Beckman-Spektralphotometer nach Reduzierung mit Natriumdithionit gemessen. Außerdem wurde das Mycel beider Stämme im Handspektroskop ebenfalls nach Reduzierung mit Natriumdithionit auf Absorptionsbanden des Cytochromsystems untersucht.

Untersuchungsergebnisse

1. Versuche zur Regeneration

Aus den bereits erwähnten Arbeiten von FROMMER konnte entnommen werden, daß der Farbstoffverlust bei *Streptomyces purpurascens* Lindenbein auf dem etwas veränderten v. PLOTTHO-Nährboden mit 0,25% Glykokoll als N-Quelle in Erscheinung tritt. Dieser Nährboden diente als Grundlage meiner Versuchsreihen. Es soll nunmehr festgestellt werden, ob es lediglich an der C- und N-Quelle oder aber an den anorganischen Zusätzen liegt, daß der *Streptomyces*-Stamm plötzlich die Fähigkeit seiner Antibioticumbildung verliert. Aus diesem Grunde wurde gleichzeitig die Wirkung von Spurenelementen (SPICHER 1955) auf Wachstum und die Rhodomycinbildung dieses Stammes untersucht.

Hierbei ergaben an anderen Streptomyceten bereits Arbeiten von SPICHER (1955), AINSWORTH u. Mitarb. (1947), SAUNDERS u. SYLVESTER (1947), THORNBERRY (1946, 1948), WAKSMAN (1950), PRINCIPE u. THORNBERRY (1952) sowie von SANCHEY-MARROQUIN u. ARCINIEGA (1953), daß eine Anzahl Streptomyceten in ihrem Wachstum bei Zugabe von Zink, Eisen, Mangan und Kupfer stark gefördert wurden. SPICHER (1955) fand für die von ihm untersuchten Streptomycetengruppen, daß Eisen/Zink, Eisen/Zink/Mangan und Eisen/Mangan/Zink/Molybdän die wirkungsvollsten Kombinationen waren.

Für meine folgenden Versuche wurde nur die Kombination Eisen/Zink gewählt, da man dem Mangan lediglich eine Beschleunigung des Wachstums (HÖHNEL 1955), jedoch keine Erhöhung der Mycelausbeute zuschreibt. Da FROMMER den Rhodomycinverlust auf den starken Überschuß des Kohlenstoffs und der damit verbundenen Versauerung des Substrates zurückführt, wurde dasselbe C:N-Verhältnis (2% Glycerin, 0,25% Glykokoll) beibehalten. Über die hiermit verbundene starke Säurebildung allgemein bei Streptomyceten berichten auch COCHRANE (1947, 1952) sowie COCHRANE u. Mitarb. (1949, 1953a, 1953b). Letzteres soll auch der Grund für die Hemmung der Antibioticumbildung sein (FROMMER 1955).

Es standen folgende Stämme von *Streptomyces purpurascens* Lindenbein aus der Sammlung des Biochemischen Institutes der Universität Göttingen zur Verfügung: Stamm *1*: Gute Rhodomycinbildung auf Medien mit KNO_3 als N-Quelle, schlechte auf Medien mit Glykokoll als N-Quelle. Auf letzterem zeigt er jedoch starkes Mycelwachstum. — Stamm *M2*: Auf Medien mit Glykokoll als N-Quelle bildet er nur Spuren von Rhodomycin, zeigt aber ebenfalls starkes Mycelwachstum. — Stamm *M2a*: Farbloser Stamm, der die Rhodomycinbildung auf Glykokoll-Nährböden vollständig verloren hat und gutes Mycelwachstum zeigt. — Stamm *P2a*: Starker Rhodomycinbildner mit schwacher Mycelbildung. — Für die folgenden Untersuchungen stehen somit alle Varianten zur Verfügung.

a) Der Einfluß der Spurenelement-Kombination Zink/Eisen auf Wachstum und Rhodomycinbildung

Zu den folgenden Versuchsreihen wurden 200 cm³-Erlenmeyer-Kölbchen stets mit 30 cm³ der jeweils angegebenen Nährlösung versehen. Die Sterilisation der Nährlösung erfolgte immer bei 120° C im Autoklaven. Die Beimpfung wurde nach Erkalten der Kölbchen mit einer Sporensuspension aus 8 Schrägröhrchen in 100 cm³ sterilem Aqua dest. vorgenommen, wovon jeweils 2 cm³ mit einer Rekordspritze ohne nochmaliges Öffnen der Kölbchen eingefüllt wurden. Diese Impfmenge entsprach etwa 0,45 mg Trockenmycel.

Tabelle 1. pH-Werte und Wachstum (mg/100 ml)

Stamm	Basal-medium	7 Tage		9 Tage		11 Tage	
		pH	Trockenmycelgewicht	pH	Trockenmycelgewicht	pH	Trockenmycelgewicht
<i>M2a</i>	A	7,3	52,0	7,2	72,7	7,0	200,0
<i>M2a</i>	B	7,3	88,7	7,4	130,0	7,4	368,3
<i>P2a</i>	A	7,3	46,3	7,4	68,3	7,7	142,7
<i>P2a</i>	B	7,3	51,0	7,5	68,4	7,8	143,4

Das Ergebnis des Versuches ist in Tab. 1 zusammengefaßt. Die Zahlen sind Mittel aus vier Parallelversuchen. Der unterschiedliche Einfluß der beiden Basalmedien bei den Stämmen *M2a* und *P2a* ist deutlich ersichtlich. Bei Stamm *M2a* zeigt sich bei Basalmedium B ein stark erhöhtes Mycelwachstum gegenüber Basalmedium A. Der rhodomycinbildende Stamm *P2a* zeigt dagegen keinerlei Unterschiede. Auf die Rhodomycinausbildung haben die hier verwendeten Spurenelemente der beiden Stämme keinen Einfluß gezeigt, da Stamm *M2a* farblos blieb und auch bei Stamm *P2a* keine Erhöhung der Werte eintrat. Versuche mit den Stämmen *1* und *M2* zeigten ebenfalls nur etwas verstärktes Mycelwachstum, jedoch keine intensivere Rhodomycinbildung.

b) Der Einfluß verschiedener organischer C- und N-Quellen auf Wachstum und Rhodomycinbildung

Durch Variieren der C- und N-Quelle wurde versucht, organische Verbindungen zu finden, die eine Regeneration der Rhodomycinbildung zulassen und weiterhin durch Einbeziehung des Basalmediums B im Falle einer Regeneration auch gleichzeitig ein stärkeres Mycelwachstum zu erhalten. Die Konzentration der C-Quelle betrug 2% und die des Stickstoffs 0,25%. Es wurden Glycerin und Glucose als C-Quelle sowie Glykokoll, l(-)Glutaminsäure, l(-)Asparagin, Difco-Pepton und Casein als N-Quelle verwendet. Die Versuche wurden zunächst mit den Stämmen *1* und *P2a* durchgeführt. Die besten Ergebnisse wurden mit Glycerin als C- und Difco-Pepton als N-Quelle erzielt, wobei die beiden Basalmedien eine entscheidende Rolle spielten. Während in Medium A eine leichte Versäuerung der Kulturlösung eintrat und somit wahrscheinlich eine Mischung von Rhodomycin und Isorhodomycinbildung hervorruft, jedoch die Tendenz stärker zur Isorhodomycinbildung zu liegen scheint, kam es in Medium B zu einer sehr guten Rhodomycinbildung. Man kann hier also ohne weiteres von einer Regeneration der Rhodomycinbildung sprechen, wobei jedoch eine Einschränkung gemacht werden muß. Sämtliche Versuche mit dem völlig farblosen Stamm *M2a* zeigten nämlich dieses Ergebnis nicht. Stamm *M2a* bildete kein Rhodomycin.

c) Der Einfluß von Kobaltchlorid auf die Rhodomycinbildung

PRINCIPE u. THORNBERRY (1952) untersuchten den Einfluß von Kobaltchlorid auf die Streptomycinproduktion von *Str. griseus* und fanden, daß die Zugabe von 0,002—0,008 m Kobaltchlorid Wachstum und Streptomycinproduktion ganz erheblich förderte. Ähnliches konnte bei Versuchen mit *Str. purpurascens* nur teilweise beobachtet werden. Bei Zugabe von 0,006 m Kobaltchlorid zu der stets verwendeten Nährlösung mit den Basalmedien A und B ergaben bei Stamm *1* und *M2a* wohl eine Steigerung des Mycelwachstums, jedoch nur bei Stamm *1* eine geringfügige Erhöhung der Rhodomycinbildung. Stamm *M2a* bildet kein Rhodomycin. Stamm *P2a* zeigte eine geringe Steigerung des Mycelwachstums und erhöhte nur unwesentlich seine Rhodomycinproduktion.

d) Der Einfluß von Kupfer auf Wachstum und Rhodomycinbildung von Stamm *M2a*

Bereits FROMMER (1955) konnte bei Stamm *M2a* eine verstärkte Phenoloxydase-Bildung feststellen. Dieses Ergebnis wurde in den noch folgenden stoffwechselphysiologischen Untersuchungen mittels Bestimmung der Katalaseaktivität und des Plattentestes nach KÜSTER (1953/1954) auf Phenoloxydase bestätigt. Es trat hierbei die Frage auf, wie

sich wohl Stamm *M2a* auf Nährlösung ohne Kupfer verhält, da ja die Phenoloxydase ein Ferment mit Kupfer in der Zentralstelle ist. Demnach dürfte dieser Stamm nur mit Kupferzugabe wachsen. Oder gewinnt er seine Rhodomycinbildung zurück?

Zu diesen Versuchen wurden wiederum 200 cm³-Erlenmeyer-Kolben mit je 30 cm³ Nährlösung, die kupferfrei gemacht wurden (s. Methodik), als Inhalt verwendet. Die Kupfersulfatkonzentration wurde von 0 bis 1 mg-% variiert. In keinem Falle wurde jedoch eine Rhodomycinbildung erhalten. Es konnte lediglich beobachtet werden, daß mit den Kupferkonzentrationen die Mycelbildung anstieg.

e) Zusammenfassung der Versuche über die Regeneration

Für den völlig farblos gewordenen Stamm *M2a* konnte kein Nährkomplex gefunden werden, der die Rhodomycinbildung regeneriert. Stamm *1* dagegen zeigte mit Medium B und Glycerin/Difco-Pepton eine gute Regeneration seiner Rhodomycinbildung. Um die Untersuchung von WILLIAMS u. MCCOY (1953) auch auf *Str. purpurascens* auszudehnen, wäre erst eine eingehende Prüfung durch langwierige Passagen notwendig. Glucose als C-Quelle ruft eine starke Versauerung hervor und verhindert damit eine Rhodomycinbildung. Diese Beobachtung konnte schon früher an einer Reihe von verschiedenen Streptomyceten gemacht werden (DÖLLE 1954). Versuche, die mit verschiedenartiger Pufferung auf pH 7,3 durchgeführt wurden, brachten kein Anwachsen der Kulturen. Aus allen diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß der Verlust der Rhodomycinbildung in tiefer liegenden stoffwechselphysiologischen Beziehungen zu suchen ist.

2. Atmungsmessungen mit der Warburg-Apparatur

Zweck dieser Untersuchung sollte es sein, festzustellen, ob Unterschiede im Atmungsverlauf der einzelnen Stämme vorhanden sind, die mit den Degenerationserscheinungen parallel liefen. Hierzu wurden Versuchsreihen mit den Stämmen *M2a* und *P2a* an wachsenden und ruhenden Kulturen unternommen. Weiterhin wurden die Atmungsmessungen noch in Parallele zu pH-Wert, Mycelgewicht, Abbau der C-Quelle und Alter der Kulturen vorgenommen. Diese Atmungsmessungen wurden nach 3, 5, 7, 11, 14 und 16 Tagen durchgeführt.

In Tab. 2 sind die Versuchsergebnisse dargelegt. Bemerkenswert ist hierbei der sehr verstärkte O₂-Verbrauch der ruhenden Kulturen des Stammes *P2a* bei Beginn der Rhodomycinbildung. An allen übrigen Tagen konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Stämmen festgestellt werden.

Aus den Versuchsergebnissen, die neben der Atmung noch durchgeführt worden sind, tauchte wie schon bei FROMMER (1955) die Frage

auf, ob in physiologischem Sinne die farblosen Stämme oder ob die Rhodomycinbildner als degeneriert betrachtet werden müssen. Stamm *M 2a* durchläuft in den ersten 3 Tagen die Lag-Phase, um dann in die logarithmische Wachstumsphase überzugehen. Letztere ist durch ein Absinken des p_H -Wertes sowie einen rapiden Abbau der C-Quelle gekennzeichnet. Dieser Wachstumsanstieg hält bis zum 11. Tage an. Zu diesem Zeitpunkt ist die kurz vorher eingetretene Eiweißausflockung sehr intensiv geworden, was auf eine verstärkte Autolyse schließen läßt. Damit ist ein langsamer Anstieg des p_H -Wertes und ein starker Rückgang des Mycelgewichtes verbunden. Es konnte dabei makroskopisch beobachtet

Tabelle 2.

Atmungsmessungen mit der Warburg-Apparatur in mg O₂/g Trockenmycelgewicht

Stamm	3. Tag	5. Tag	7. Tag	11. Tag	14. Tag	16. Tag
			(Beginn der Rhodomycin- bildung)			
<i>M 2a</i> farblos	5,7	4,15	3,8	3,46	1,37	0,76
<i>P 2a</i> farbig	6,04	5,8	10,52	2,83	2,07	2,06

werden, daß die ansonst festen Kolonien sich lockerten und in feine Partikelchen zerfielen. Man kann somit den Entwicklungsverlauf des farblosen Stammes *M 2a* durchaus als den normalen betrachten. Der starke Rhodomycinbildner Stamm *P 2a* dagegen verhält sich ganz anders. Bei ihm kann man keine derartigen Unterschiede im Wachstumsverlauf erkennen. Die Entwicklung geht gleichmäßig langsam unter starker Rhodomycinbildung vor sich. Parallele Versuche zeigten die gleichen Ergebnisse. Daraus ergibt sich, daß die Degenerationserscheinung nicht in der unterschiedlichen Atmungsintensität, sondern in anderen Stoffwechselvorgängen zu suchen ist. Durch Untersuchungen auf diesem Gebiete ist vielleicht auch das Auftreten der Abweichung der Atmungsintensität beim Eintreten der Rhodomycinbildung zu klären.

3. Sonstige stoffwechselphysiologische Untersuchungen

Bei diesen Untersuchungen wurde immer, wenn nicht besonders angegeben, Basalmedium A mit 2% Glycerin und 0,25% Glykokoll verwendet. Auf den bisherigen Beobachtungen aufbauend, wurden in den folgenden Versuchsreihen p_H -Wert, Trockenmycelgewicht, Substrat-Eiweiß-Bildung, Abbau der C-Quelle, Bildung von Aldo- und Ketoverbindungen, der Amid- und NH_4 -Stickstoff-Gehalt der Nährlösung sowie die Katalaseaktivität und die Menge des gebildeten Rhodomycinons quantitativ bestimmt. Die qualitativen Untersuchungen erstreckten sich auf die Bildung der organischen Fettsäuren, die Bestimmung des Auf-

tretens von Phenoloxydase und Cytochromen sowie freien Aminosäuren in der Kulturlösung.

Die Kulturen wurden in 1 l-Kolben, die mit je 150 cm³ obiger Nährlösung gefüllt waren, angesetzt. Die Beimpfung erfolgte mit 10 cm³ einer in sterilem Aqua dest. hergestellten Sporensuspension. Bebrütung und Kultivierung erfolgte auf einer Schüttelapparatur mit der Frequenz von 152 Hin- und Herbewegungen je Minute im Brutraum bei 28° C.

Wegen technischer Schwierigkeiten, die durch das begrenzte Fassungsvermögen der zur Verfügung stehenden Schüttelapparatur auftraten, konnte nur einmal ein umfassender Vergleich aller vier Stämme mit den oben angegebenen Bestimmungen durchgeführt werden. Zahlreiche Versuche derselben Art wurden vorher mit jeweils zwei Stämmen angestellt, wobei ich jede Kombination mehrfach prüfte. Da sich die Ergebnisse kaum unterschieden, wird im folgenden das mittlere Ergebnis dieser Versuche besprochen werden. Eine Ausnahme hiervon macht lediglich die Bestimmung der freien Aminosäuren in der Nährlösung, die nur im großen Vergleichsversuch mit allen 4 Stämmen durchgeführt wurde.

Tabelle 3. Stoffwechselphysiologischer Vergleich von 4 Stämmen

	Stamm	1. Tag	3. Tag	6. Tag	11. Tag	16. Tag
pH-Werte	1	7,3	7,2	6,8	6,4	5,4
	M 2	7,2	6,9	6,6	6,0	5,7
	M 2a	7,3	7,0	6,9	6,6	6,9
	P 2a	7,3	7,3	7,5	7,6	8,1
Rhodomycinon-Bestimmung (mg/100 ml)	1	—	—	—	0,2	0,5
	M 2	—	—	—	0,4	0,6
	M 2a	—	—	—	—	—
	P 2a	—	—	0,1	1,2	4,0
Rest-glycerin (g/l)	1	16,7	16,0	15,0	1,8	0,5
	M 2	17,3	12,2	7,7	0,8	
	M 2a	nicht	17,0	1,4	nicht mehr	nachweisbar
	P 2a	gemessen	18,0	15,0	6,0	
Ökonomischer Koeffizient	1	nicht	1,7	8,2	15,0	19,0
	M 2	bestimmt	0,7	1,4	10,0	19,0
	M 2a	nicht	2,7	9,9	19,0	18,0
	P 2a	bestimmt	2,6	7,2	8,0	9,0

a) pH-Wert, Wachstum und Rhodomycinbildung

Ein Blick auf Tab. 3 zeigt bereits den großen stoffwechselphysiologischen Unterschied zwischen den einzelnen Stämmen. Im Wachstum zeigt ihn ebenso deutlich Abb. 1. Der pH-Wert des farblosen Stammes M 2a sinkt vom eingestellten 7,3 der Kulturlösung über den Neutralpunkt in den schwach sauren Bereich, um dann wieder bis zum Neutralpunkt anzusteigen. Mit dem langsamen Absinken, das vom 5. Tage an

erfolgt, geht ein starkes Mycelwachstum vonstatten. Nach einer kurzen Lag-Phase von 3 Tagen folgt somit ein starker Anstieg der Mycelausbildung. Am 11. Tage hat er den höchsten Wert und den tiefsten p_H -Wert erreicht. Eine leichte Eiweißausflockung deutet bereits die beginnende Autolyse an. Mit letzterer ist ein Ansteigen des p_H -Wertes und ein Absinken des Mycelgewichtes verbunden. Eine Rhodomycinbildung konnte nicht beobachtet werden. Dagegen trat eine leichte Gelbfärbung ein,

die bis zum Abschluß des Versuches an Intensität zunahm. Versuche, diesen Farbstoff mit Äther auszuschütteln, scheiterten. Der Verlauf der Wachstumskurve dieses farblosen Stammes *M2a* zeigt den allgemeinen bei Bakterien und Pilzen bekannten Verlauf, wie er als normal bezeichnet wird.

Diesem Stamm gegenüber steht der aktive Rhodomycinbildner Stamm *P2a*. Sein p_H -Wert steigt vom Beginn der Kultur langsam bis zum 16. Tage an, wo er einen p_H -Wert von 8,1 erreicht hat. Die Mycelausbildung ist äußerst schwach. Auch bei ihm kann man eine kurze Lag-Phase unterscheiden, jedoch verläuft die logarithmische Wachstumsphase nur mit schwachem Anstieg.

Am 16. Tage erreicht das Mycelgewicht von Stamm *P2a* nur knapp

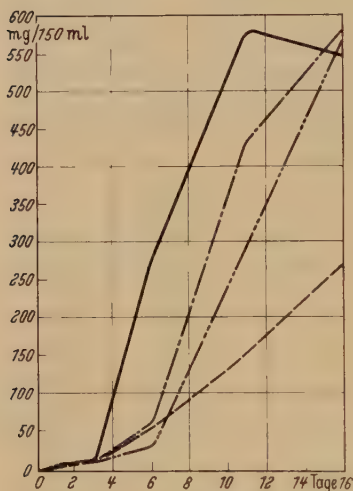


Abb. 1. Verlauf der Trockensubstanzbildung der 4 *purpurascens*-Stämme.

Stamm 1 ———; Stamm *M2a* ————;
Stamm *P2a* — · — · —; Stamm *M2* — · — · —

die Hälfte von dem des Stammes *M2a* am 11. Tage (Abb. 1). Bis zum Ende des Versuches konnte keine Autolyse in bezug auf das Mycelgewicht festgestellt werden; diese trat auch nach 3 Wochen Kulturdauer noch nicht ein. Konnte man bereits nach 4 Tagen eine Rhodomycinbildung des Mycels beobachten, so war diese auch bereits nach 6—7 Tagen im Kulturfiltrat meßbar. Diese Farbstoffbildung nahm täglich zu und erreichte am Ende der Untersuchungen den Höchstwert des Versuchs von 4 mg/100ml.

Die Stämme 1 und *M2* liegen in Wachstum und Rhodomycinbildung zwischen den beiden vorher genannten Stämmen. Beide haben das starke Absinken des p_H -Wertes in den sauren Bereich und das starke Ansteigen des Mycelwachstums sowie eine geringe Rhodomycinbildung gemeinsam. Nach einer kurzen Lag-Phase, der ein langsames Wachstum bis zum 6. Tage folgt, steigen sie stark an und erreichen am 16. Tage

nahezu den Wert des farblosen Stammes *M2a* vom 11. Tage. Ohne Zweifel haben wir es hier mit zwei Zwischenstämmen zu tun, da beide nach FROMMER früher gute Rhodomycinbildner waren. Auch bei ihnen konnte noch keine Autolyse erreicht werden. Es wurden einige Kulturen bis zu 22 Tagen kultiviert, ohne daß beide Stämme ein Absinken des Mycelwachstums zeigten. Ihr Mycelgewicht stieg dabei bis über 800 mg/150 ml an. Da das Hauptaugenmerk auf die Stämme *M2a* und *P2a* gelegt wurde, interessierte eine noch weitergehende Untersuchung nicht.

b) Abbau der Kohlenstoffquelle

Der Abbau der Kohlenstoffquelle geht im großen und ganzen dem Wachstum parallel. Bis zum Ende seiner Lag-Phase baut der farblose Stamm *M2a* die Kohlenstoffquelle nur geringfügig ab, sehr stark jedoch vom 3.—6. Tage. Bereits nach 11 Tagen kann kein Glycerin mehr nachgewiesen werden. Auch dieses Bild zeigt den gleichen Charakter wie ein Bakterien- oder Pilzstamm in seiner normalen Form. Nach vollständigem Verbrauch der C-Quelle tritt die Autolyse ein. Der aktive Rhodomycinbildner *P2a* baut demgegenüber seine C-Quelle äußerst langsam ab. Nach 11 Tagen Kulturdauer sind immer noch 6 g/L, d. h. 0,6% Glycerin vorhanden. Erst am 16. Tage ist so viel verbraucht, daß mit dieser Methode nichts mehr nachgewiesen werden konnte. Die beiden Stämme *1* und *M2* halten sich wie schon beim Wachstum so auch hier zwischen den beiden Stämmen *M2a* und *P2a*.

Wie der ökonomische Koeffizient zeigt, arbeitet der aktive Rhodomycinbildner-Stamm *P2a* sehr unökonomisch, was vor allem nach Eintritt der Rhodomycinbildung zum Ausdruck kommt und völlig den oben dargestellten Ergebnissen der Atmungsversuche entspricht. Am ökonomischsten arbeitet der farblose Stamm *M2a*. Die ab 11. Tage erhaltenen Werte fand auch HÖHNL (1955) mit *Sphaerotilus natans* bei Glucose als C-Quelle. Die beiden anderen Stämme *1* und *M2* neigen schon mehr zu Stamm *M2a*. Sie haben sich trotz der noch geringen Farbstoffbildung eindeutig vom Stamm *P2a* distanziert.

c) Substrat-Eiweiß-Bildung

Neben den pH-Werten, Wachstum und Abbau der C-Quelle sind die Unterschiede auch im Substrat-Eiweiß-Gehalt der Nährlösung beträchtlich, wie aus Abb. 2 ersichtlich ist. Der farblose Stamm *M2a* zeigt von Beginn an eine starke Eiweißbildung im Substrat, die vom 6. Tage an etwas nachläßt, um dann wieder steil anzusteigen, was durch die eintretende Autolyse bedingt ist.

Beim aktiven Rhodomycinbildner Stamm *P2a* fällt die Eiweißbildung mit dem Beginn der Rhodomycinbildung zusammen. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß das Rhodomycin mit dem hier angewendeten

Reagens ebenfalls ausfällt. Es scheint so, als ob vorwiegend der Farbstoff und kaum Eiweiß gebildet wird.

Die Stämme 1 und M2 zeigen abermals eine sehr gute Übereinstimmung. Allerdings ist das Nachlassen der Eiweißbildung nach dem 16. Tage unerklärlich. Dieser Eigenart wurde nicht weiter nachgegangen.

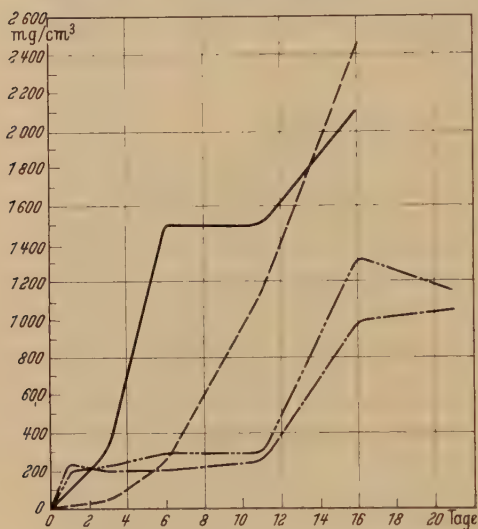


Abb. 2. Verlauf der Substrat-Eiweißbildung bei 4 *purpurascens*-Stämmen.

Stamm 1 — · — · — · — ; Stamm M2 — · — · — · — ;
Stamm M2a — — — — — ; Stamm P2a — — — — —

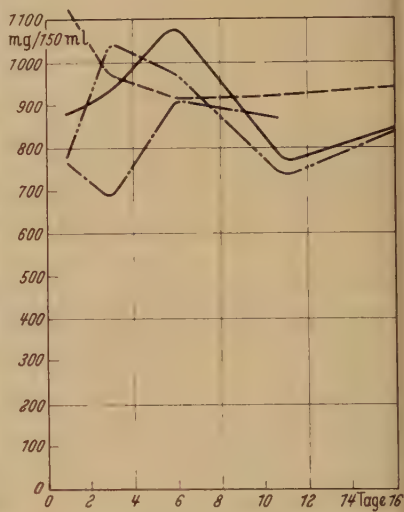


Abb. 3. Gesamt-Hydrazon-Fällung bei 4 *purpurascens*-Stämmen.

Stamm 1 — · — · — · — ; Stamm M2a — — — — — ;
Stamm P2a — — — — — ; Stamm M2 — · — · — · —

d) Gesamt-Hydrazonfällung

Weniger aufschlußreich sind die Mengen der als Hydrazone gefällten Aldo- und Ketoverbindungen (Abb. 3), die anschließend auf ihre Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln geprüft wurden. Hier gab es dagegen deutliche Unterschiede, wie aus Tab. 4 ersichtlich ist. Es wurden hierbei nur die Hydrazone der Stämme M2a und P2a berücksichtigt. Im Zweifelsfalle wurde eine Extraktion mit dem jeweiligen Lösungsmittel durchgeführt.

Versuche, die Hydrazone mit Hilfe der Säulenchromatographie zu trennen, konnten nicht durchgeführt werden. Es zeigte sich, daß bei dem farblosen Stamm derart zahlreiche verschiedene Zonen am sauren Aluminiumoxyd auftraten, daß selbst die beträchtlich anfallenden Mengen zu gering waren. Probeweise wurden einige wenige Zonen aus dem sauren Aluminiumoxyd herausgelöst und auf basisches Aluminiumoxyd gebracht. Hierbei zeigte sich, daß eine einzige Zone vom sauren Aluminiumoxyd sich nochmals in 6—8 Zonen, die sich deutlich in ihren

Farben voneinander unterschieden, auf dem basischen Aluminiumoxyd aufteilen ließen. Wegen der sich daraus ergebenden technischen Schwierigkeiten mußten die Versuche in dieser Richtung aufgegeben werden.

Tabelle 4. Löslichkeit der Hydrazone der Stämme M 2a und P 2a

Lösungsmittel	Stamm M 2a				Stamm P 2a			
	nach 3 Tagen	nach 6 Tagen	nach 11 Tagen	nach 16 Tagen	nach 3 Tagen	nach 6 Tagen	nach 11 Tagen	nach 16 Tagen
Äthanol	—	—	++++	—	—	—	—	—
Methanol	—	+++	++++	+++	—	++	—	—
n-Butanol	—	+++	—	—	—	+++	++	++++
Benzol	+++	—	—	—	—	++++	++++	(+)
Octanol	—	—	—	—	(+)	—	++	—
n-Hexan	—	—	—	—	++++	—	—	—
Toluol	++++	—	—	—	—	—	(+)	—
Chloroform	—	—	++	+++	—	—	—	—

Zeichenerklärung: — nicht löslich, (+) in Spuren löslich, + schwach löslich, ++ löslich, +++ gut löslich, ++++ sehr gut löslich

Man muß hierbei stets beachten, daß die Fällungen aus dem stark eingeeengten entweißten Filtrat vorgenommen worden sind. Bei dieser unbedingt notwendigen starken Einengung können zahlreiche rein chemische Nebenreaktionen auftreten, wozu in der Diskussion noch Stellung genommen wird.

e) Katalaseaktivität

Es wurde bereits erwähnt, daß FROMMER (1955) von einem stärkeren Auftreten der Phenoloxydase bei dem farblosen Stamm sprach. Zur Bildung der Antibiotica ist Sauerstoff für die Oxydation aus den Vorstufen notwendig. Dieser sehr wahrscheinlich enge Zusammenhang zwischen der Farbstoffbildung und der Atmung (RIPPEL-BALDES 1955) war der Grund zur Bestimmung der Katalaseaktivität. Das Vorhandensein von Katalase ist auch gleichzeitig das Zeichen für das Vorhandensein von Cytochromoxydase (GALE 1952).

Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt Abb. 4. Der farblose Stamm M 2a zeigt lediglich nach 3 Tagen eine Katalaseaktivität, die aber schon

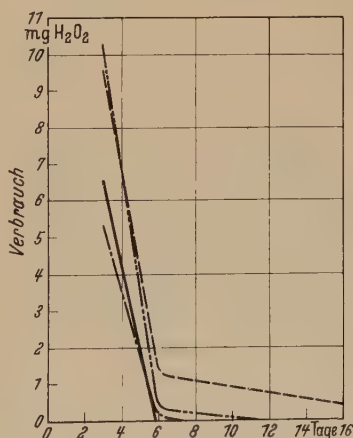


Abb. 4. Katalaseaktivität der 4 purpurascens-Stämme. Katalaseaktivität: Verbrauch an H_2O_2 nach 30 min-Blindwert mg Trockengewicht

nach 6 Tagen nicht mehr vorhanden ist. Stamm *P2a* dagegen behält eine gewisse Konstanz seiner Aktivität bei. Die Stämme *I* und *M2* zeigen wieder ihre Mittelstellung, die jedoch mehr zum farblosen Stamm zu neigen scheint. Die starke Katalaseaktivität zu Beginn des Wachstums stimmt mit Beobachtungen von LENHOFF u. KAPLAN (1953) an *Pseudomonas fluorescens* überein, wonach in stark belüfteten Kulturen die Katalaseaktivität erheblich geringer sein soll als in unbelüfteten Kulturen.

f) Amid- und NH_4 -Stickstoff-Gehalt der Nährlösung

Bei den stoffwechselphysiologischen Untersuchungen trat auch die Frage auf, wo der Stickstoff beim aktiven Rhodomycinbildner bleibt, wenn er — wie bereits aufgezeigt — so unökonomisch arbeitet. BROCKMANN u. Mitarb. (1951) sowie FRANK (1952) identifizierten das Rhodomycin als ein Oxy-Anthrachinon. Zum Aufbau dieses Antibioticums ist kein Stickstoff notwendig, weshalb er mit der Länge der Kulturdauer in der Kulturlösung zunehmen mußte. Bei den anderen Stämmen ist das infolge ihrer ökonomischen Arbeitsweise nicht der Fall. Die Ergebnisse

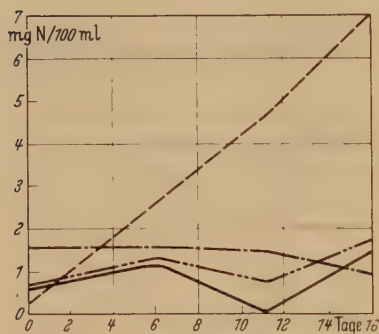


Abb. 5. Amid- und Ammoniak-Gehalt der 4 *purpurascens*-Stämme.

Amid- und NH_4 -N-Gehalt der Nährlösung.
Stamm *I* ———; Stamm *M2a* ———;
Stamm *P2a* ———; Stamm *M2* ———

(Abb. 5) bestätigen obige Überlegungen. Die Kurve von Stamm *P2a* steigt im Laufe der Kulturdauer kontinuierlich bis auf 7,0 mg N/100 ml an. Alle drei anderen Stämme verhalten sich nahezu gleichmäßig bis zum 6. Tage. Der farblose Stamm *M2a* benötigt seinen Stickstoff für das starke Anwachsen seiner Mycelbildung, was ebenfalls bei Stamm *I* und *M2* zu beobachten ist. Im Autolysestadium steigt dann bei Stamm *M2a* der Stickstoff-Gehalt wieder etwas an. Das Ansteigen bei Stamm *M2* geht mit der geringeren Rhodomycinbildung parallel.

g) Bildung von organischen Fettsäuren

An Hand der Papierchromatographie konnte festgestellt werden, daß der farblose Stamm *M2a* in der Anzahl weniger Fettsäuren bildete als Stamm *P2a*, wie Tab. 5 zeigt. Bei Stamm *M2a* konnte außer Milchsäure keine andere Säure gefunden werden. Der rhodomycinbildende Stamm zeigt zunächst eine starke Essigsäurebildung, die jedoch im Laufe der Kulturdauer nachläßt. Dafür tritt Propionsäure stärker in den Vordergrund; auch Valeriansäure tritt auf. Am 16. Tage konnte

schließlich nur noch Valeriansäure, wenn auch schwächer als nach 11 Tagen, wo sie die vorherrschende Säure ist, nachgewiesen werden. Weiterhin konnte festgestellt werden, daß einige Säuren des Säurecyclus gebildet werden, die wegen zu geringer Menge und der Schwierigkeit einer Chromatographie nicht eindeutig bestimmt werden konnten.

Tabelle 5. Organische Fettsäuren der Stämme *M 2a* und *P 2a*

	Stamm <i>M 2a</i>				Stamm <i>P 2a</i>			
	Milch-säure	Essig-säure	Propion-säure	Valerian-säure	Milch-säure	Essig-säure	Propion-säure	Valerian-säure
nach 3 Tagen	++	—	—	—	(+)	+++	—	—
nach 6 Tagen	+++	—	—	—	—	++	++	(+)
nach 11 Tagen	+++	—	—	—	(+)	+	+	+++
nach 16 Tagen	+++	—	—	—	(+)	—	—	++

Zeichenerklärung: — nicht vorhanden, (+) in Spuren vorhanden, + schwache Bildung, ++ gute Bildung, +++ sehr gute Bildung

h) Bildung von Phenoloxydase

Für die Untersuchungen auf die Bildung von Phenoloxydase wurde der Plattentest (KÜSTER 1953/54) verwendet. Hierbei konnte beobachtet werden, daß der farblose Stamm *M 2a* am stärksten Phenoloxydase bildet, Stamm *P 2a* nur sehr wenig. Die Stämme *M 2* und *1* stehen in ihrem Stoffwechsel zwischen den beiden Stämmen wie in allen sonstigen Untersuchungen.

Nach den Ergebnissen der Katalaseaktivität und der Phenoloxydase-Bildung scheint *Str. purpurascens* beide Enzymgruppen zu besitzen.

i) Bestimmung der Cytochrome

Es lag nun sehr nahe, das Cytochromsystem der beiden Stämme *M 2a* und *P 2a* einer eingehenderen Untersuchung zu unterziehen. Hierbei stellte es sich heraus (Abb. 6 u. 7), daß der Stamm *M 2a* ein komplettes Cytochromsystem besitzt, was bei Stamm *P 2a* nicht der Fall ist. Dieser Stamm *P 2a* besitzt kein einziges Cytochrom. Außer den Messungen am DU-Beckmann-Spektralphotometer wurden die damit erzielten Ergebnisse nochmals im Handspektroskop nachgeprüft. Die Maxima sowie die Banden des Stammes *M 2a* stimmten nach HOLLMANN u. THOFERN (1955) sowie TISSIERES u. MITCHELL (1954) mit denen vom Cytochrom ($a + a_3$) bei 603—605 m μ und Cytochrom *b* bei 561—567 m μ überein. Im Handspektroskop konnte weiterhin noch eine dritte Bande ermittelt werden, die im Bereich von 540 m μ liegen muß. Es könnte sich hier wahrscheinlich nach TISSIERES u. MITCHELL um das Cytochrom *c* handeln. Es fehlt jedoch der eindeutige Nachweis im Spektralphotometer. Der rhodomycinbildende Stamm *P 2a* dagegen zeigte keinerlei Maxima oder Bande

und besitzt somit auch keine Cytochrome. Das geringe Maximum bei 605 m μ entspräche dem Cytochrom ($a + a_3$), konnte jedoch im Hand-spektroskop nicht nachgewiesen werden.

In Verbindung mit den vorangegangenen Versuchen drängt sich nun die Frage auf, wieso der im Cytochromsystem völlig defekte Stamm *P 2a* eine gewisse Konstanz in der Katalasebildung zeigt, was ja bei dem farblosen Stamm *M 2a* nicht der Fall ist. JENSEN u. THOFERN (1953a; 1953b; 1954) untersuchten dieses Problem an einer streptomycinresistenten Variante von *Micrococcus pyogenes*

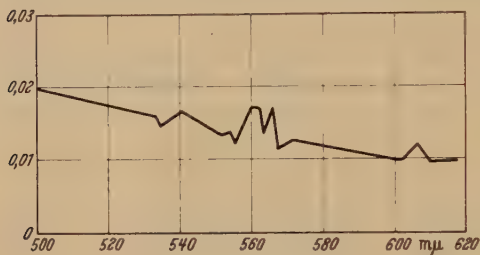


Abb. 6. Cytochromsystem von Stamm *M 2a*

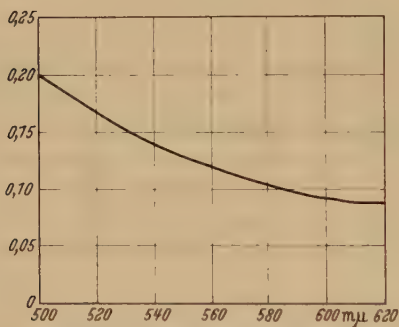


Abb. 7. Cytochromsystem von Stamm *P 2a*

var. *aureus*. Sie konnten hierbei feststellen, daß „die Bindung zwischen prosthetischer Gruppe und Apoferritin bzw. der Bindungsmechanismus bei der Katalase grundsätzlich anders sein muß als bei den für die Atmung dieses Bakterienstammes verantwortlichen Hämatinfermenten. Diese wurden mittels eines Protoporphyrin-Kobalt-Komplexes gehemmt, wobei keine Beeinträchtigung der katalatischen Fähigkeiten eintrat“. Dieselbe Wirkung zeigt auch das Zink-Mesoporphyrin. THOFERN (1957) erklärt sich das Vorhandensein der Katalase bei Organismen, die keine Cytochrome besitzen, folgendermaßen: Der Wasserstoff, der normalerweise vom Flavinenzym an das Cytochromsystem abgegeben wird, verbindet sich sofort mit dem molekularen Sauerstoff zu Wasserstoffsuperoxyd, das mittels der Katalase wieder gespalten werden muß, soll der Organismus lebensfähig

bleiben. Kann nun dieser Wasserstoff an das Cytochromsystem abgegeben werden, so bildet sich Wasser, und die Katalase ist nicht unbedingt erforderlich. Ähnlich scheint es bei den Stämmen *M 2a* und *P 2a* zu sein.

k) Untersuchungen der Kulturlösung auf freie Aminosäuren

Alle Versuche, freie Aminosäuren aus der Kulturlösung mittels der Papierchromatographie zu bestimmen, scheiterten an dem relativ hohen Gehalt derselben an Glykokoll. Immer wieder machte der große Glykokollfleck eine Identifizierung trotz mehrmaligem Laufen des Lösungsmittels unmöglich. Die Untersuchungen auf freie Aminosäuren in der Kulturlösung bei Gegenwart von Glykokoll als N-Quelle von CORUM u. Mitarb. (1954) konnten somit bei den hier vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden.

1) Beobachtungen an Mischkulturen

Bei diesen Versuchen sollte festgestellt werden, ob sich die beiden Stämme in Mischkulturen gegenseitig beeinflussen. Zu diesem Zwecke wurden die Kölbchen mit den Stämmen *M2a* und *P2a* im Verhältnis 1/10 zu 9/10 und 9/10 zu 1/10 beimpft. Es zeigte sich, daß der Stamm *M2a* in jedem Falle Stamm *P2a* unterdrückt, wobei dieser (*P2a*) auch bei starker anfänglicher Überlegenheit weder zum Wachstum noch zur Rhodomycinausbildung kam, jedoch, wie Isolierungsversuche zeigten, noch lebensfähig war.

Diskussion

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, daß das Problem des Rhodomycinverlustes in Änderungen des stoffwechselphysiologischen Geschehens seinen Ursprung hat. Die Rhodomycinbildung konnte nur bei den Stämmen auf eiweißhaltigen Nährböden nahezu regeneriert werden, die die Fähigkeit zur Bildung dieses Farbstoffes noch nicht restlos verloren haben. Bei dem farblosen Stamm *M2a* ist es auch mit den verschiedensten Zusätzen nicht geglückt, solange nur organische N-Quellen benutzt wurden. Mit Kaliumnitrat dagegen bildete auch Stamm *M2a* wieder Rhodomycin. Dieser letzte Versuch wurde von FROMMER (1955) eingehend behandelt und von mir lediglich nochmals nachgeprüft. Es besteht also somit das Phänomen, daß derselbe Stamm *M2a*, der auf Glycerin-Glykokoll-Nährboden farblos heranwächst, mit Kaliumnitrat wieder Rhodomycin bildet.

Die Nährböden mit Glycerin als C- und Glykokoll oder einer anderen Aminosäure als N-Quelle sind für die Kultivierung von *Streptomyces purpurascens* Lindenbein zwecks Gewinnung des Antibioticums somit ungeeignet. Er verliert nach einigen Passagen die Fähigkeit, dasselbe auszubilden. Die Untersuchungen zeigten weiter die großen Unterschiede zwischen dem farblosen und dem aktiven rhodomycinbildenden Stamm. Der gestörte Stoffwechselvorgang als solcher ist jedoch infolge der zahlreich möglichen rein chemischen Nebenreaktionen sehr undurchsichtig. Aminosäuren — insbesondere Glykokoll — können rein chemisch bereits bei Zimmertemperatur mit Aldehydverbindungen wie verschiedenen Zuckern, Glycerinaldehyd u. a., wobei durchaus Melanine oder Melanoidine entstehen können (ENDERS 1942), mit Ketoverbindungen wie Dioxy-aceton und Brenztraubensäure (NEUBERG 1927), weiterhin mit Sulfid, Sulfit und freien SH-Gruppen (SCHÖBERL 1940) reagieren. Beim Auftreten von Glutathion im Eiweiß kann aber auch das so wichtige Cytochrom *c* reduziert werden (SCHÖBERL 1940). So wie dieses Tripeptid können aber auch Dipeptide mit Aminosäuren reagieren (NEUBERG 1927). Alle diese Annahmen würden vielleicht die äußerst zahlreichen Zonen, die bei der Säulenchromatographie der ausgefällten Hydrazone des farb-

losen Stammes *M2a* an basischem und saurem Aluminiumoxyd auftraten, bestätigen.

Stark in den Vordergrund drängt sich nun auch die Frage, welcher Stamm als der „normale“ zu betrachten ist. An Hand der vorliegenden Versuche möchte man dazu neigen, den rhodomycinbildenden Stamm als degeneriert anzusprechen. Der farblose Stamm *M2a* zeigt auf alle Fälle die als normal bezeichnete Wachstumskurve. Außerdem konnte bei den Regenerationsversuchen bei Stamm *I* eindeutig festgestellt werden, daß bei einer verstärkten Ausbildung des Rhodomycins die Mycelbildung zurückgeht. Bei Pilzen und auch bei Bakterien wird die Art der Kurve, wie sie Stamm *M2a* aufzeigt, mit einer mehr oder weniger langen Lag-Phase, der die logarithmische Wachstumsphase bis zum Eintritt der Autolyse folgt, wo schließlich das Mycelwachstum aufhört, als normal bezeichnet. Auch die Ausscheidung bzw. Bildung des gelben bis dunkelgelben Farbstoffes läßt darauf schließen. RIPPEL-BALDES 1955 und KÜSTER 1953/54 stellten ja bereits fest, daß im natürlichen Stoffwechsel in dem Stadium der Autolyse eine Bildung von Humusstoffen aus gewissen Vorstufen vonstatten gehen kann. Damit könnte möglicherweise die Rhodomycinbildung in Parallele gesetzt werden. Bemerkenswert ist hierbei der sehr verstärkte O_2 -Verbrauch der ruhenden Kulturen des Stammes *P2a* bei Beginn der Rhodomycinbildung. Zu diesem Zeitpunkt konnte ebenfalls ein starker Unterschied im ökonomischen Koeffizienten zwischen Stamm *M2a* und *P2a* festgestellt werden. Stamm *P2a* tritt in eine äußerst unökonomische Arbeitsweise. Dabei bleibt aber unerklärlich, warum die zu Beginn der Rhodomycinbildung festgestellte „verschwenderische Atmung“ nicht fortgesetzt wird, obwohl die Rhodomycinbildung erst etwa ein Drittel ihres endgültigen Wertes erreicht, es sei denn, daß bereits die notwendigen Vorstufen gebildet sind. Unerklärt bleibt auch das Auftreten des Ammoniaks bei Stamm *P2a*, dessen Wert mit der Kulturdauer zunimmt. Dieses ist entweder die Folge einer ständig erfolgenden Autolyse oder aber der unökonomischen Arbeitsweise und der einhergehenden Rhodomycinbildung, wobei Ammoniak aus dem Glykokoll freigesetzt wird. Weiterhin konnte ein totaler Defekt im Cytochromsystem bei Stamm *P2a* festgestellt werden. Die aufgezeigte „verschwenderische Atmung“ der rhodomycinbildenden Stämme mit dem abnehmenden ökonomischen Koeffizienten als Folge sowie der Verlust des Cytochromsystems und das Verhalten in Mischkulturen dürften jedenfalls dafür sprechen, daß diese den nicht-rhodomycinbildenden Stämmen gegenüber als weniger normal anzusehen sind¹.

¹ MATHEWS (1956) fand bei einem weißen Stamm von *Bact. prodigiosum* im Vergleich zum roten: Zellen etwas länger und etwas Tendenz zur Kokkenbildung, etwas resistenter gegen Streptomycin, etwas erhöhten Atmungsquotienten. Kein Unterschied in Kolonien, Morphologie, Wachstum auf verschiedenen Nährböden,

Zusammenfassung

1. Es wurden 4 Stämme von *Streptomyces purpurascens* Lindenbein auf dem die Degeneration der Rhodomycinbildung hervorrufenden Medium mit Glycerin als C- und Glykokoll als N-Quelle untersucht.

2. Mit der Spurenelement-Kombination Zink/Eisen, verschiedenen organischen C- und N-Quellen sowie mit Kobaltchlorid und Kupfer gelang keine Regeneration der Rhodomycinbildung bei dem farblosen Stamm *M2a*.

3. Atmungsmessungen mit der Warburg-Apparatur an ruhenden und wachsenden Kulturen in verschiedenen Zeitabständen und in bestimmten Altersstadien aus Schüttelkulturen zeigten am Beginn der Rhodomycinbildung eine starke Steigerung bei dem Rhodomycinbildner Stamm *P2a* gegenüber dem farblosen Stamm *M2a*, während vorher und nachher keine wesentlichen Unterschiede vorhanden waren.

4. Stamm *P2a* zeichnet sich aus durch höheren pH-Wert, geringeres Trockenmycelgewicht, hohe Rhodomycinbildung, schwachen Abbau der C-Quelle Glycerin, Substrat-Eiweiß-Bildung, gleichen Gesamtgewichtes der fällbaren Hydrazone, ständig vorhandene Katalaseaktivität, höheren Amid- und NH_4 -Stickstoff-Gehalt der Nährlösung, Bildung von Essig-, Propion- und Valeriansäure (gegenüber Milchsäure bei Stamm *M2a*) und äußerst geringer Phenoloxydase.

5. Cytochrom-Bestimmungen des Stammes *M2a* zeigten bei 560 bis 567 $\text{m}\mu$ und 603 $\text{m}\mu$ eindeutige Maxima der Cytochrome *b* und ($a + a_3$). Im Handspektroskop konnte noch eine weitere Bande bei 540 $\text{m}\mu$ ermittelt werden, die dem Cytochrom *c* entspräche. Stamm *P2a* zeigte dagegen lediglich bei 605 $\text{m}\mu$ eine Andeutung eines Maximums, das jedoch im Handspektroskop nicht nachgewiesen werden konnte.

6. In Mischkultur wurde Stamm *P2a* auch bei starker Impfungsüberlegenheit von Stamm *M2a* unterdrückt. Aus allen Beobachtungen kann geschlossen werden, daß der rhodomycinbildende Stamm *P2a* dem farblosen Stamm *M2a* gegenüber als „degeneriert“ anzusprechen ist.

Herrn Prof. Dr. A. RIPPEL möchte ich für die Anregung zu dieser Arbeit und das Interesse, das er ihr stets entgegenbrachte, herzlich danken. Herrn Dr. THOFERN vom Hygiene-Institut der Universität danke ich für die wertvollen Hinweise und Anregungen bei der Messung der Cytochrome, Herrn Prof. Dr. BODE von der Hautklinik für das Entgegenkommen, das mir die Ultraschall-Behandlung meiner *Streptomyces*-Stämme ermöglichte, desgleichen Herrn Prof. Dr. HOLLMANN und Herrn Dr. THIELE vom Institut für physiologische Chemie der Universität für die Erlaubnis, die Messungen am DU-Beckman-Spektralphotometer durchzuführen.

Ausgeführt mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Resistenz gegen Penicillin und antibiotische Bakterien. Bei der Bildung von Prodigiosin handelt es sich danach wohl um ganz andere physiologische Zusammenhänge als bei der Bildung von Rhodomycin.

Literatur

- AINSWORTH, G. C., and coll.: *J. Gen. Microbiol.* **1**, 335 (1947).
- BROCKMANN, H., u. Mitarb.: *Chem. Ber.* **84**, 700 (1951). — BROCKMANN, H., u. B. FRANK: *Chem. Ber.* **88**, 1792 (1955).
- COCHRANE, V. W.: *J. Bacter.* **54**, 29 (1947); **63**, 459 (1952). — COCHRANE, V. W., and I. DIMMICK: *J. Bacter.* **58**, 723 (1949). — COCHRANE, V. W., and H. D. PECK: *J. Bacter.* **65**, 37 (1953a). — COCHRANE, V. W., H. D. PECK jr. and A. HARRISON: *J. Bacter.* **66**, 17 (1953b). — CORUM, C. J., u. Mitarb.: *Z. anal. Chem.* **119**, 189 (1940).
- DÖLLE, H.: *Zbl. Bakter. II Orig.* **108**, 127 (1954). — *Nachr.bl. dtsh. Pflanzenschutzdienst (Berlin)* **10**, 191 (1954).
- ENDERS, C.: *Biochem. Z.* **312**, 339 (1942); **313**, 174 (1942). — *Die Chemie* **56**, 281 (1943).
- FROMMER, W.: *Arch. Mikrobiol.* **23**, 105 (1955); **23**, 385 (1956).
- GALE, E. F.: *The chemical activities of Bacteria*. New York and London: Acad. Press Inc., University Tutorial Press Ltd. 1952.
- HÖHNEL, G.: *Arch. Mikrobiol.* **23**, 207 (1955). — HOLLMANN, S., u. E. THOFERN: *Naturwissenschaften* **42**, 586 (1955). — HEUSCHKA, H.: *Arch. Mikrobiol.* **28** [(1957) im Erscheinen].
- JENSEN, J., u. E. THOFERN: *Z. Naturforsch.* 8b, 599 (1953a); 8b, 604. (1953b); **9b**, 596 (1954).
- KÜSTER, E.: *Zbl. Bakter. I Orig.* **160**, 20 (1953/54).
- LENHOFF, H. M., and N. O. KAPLAN: *Nature (Lond.)* **172**, 730 (1953).
- MATHEWS, M. M.: *J. of Hered.* **47**, 85 (1956).
- NEUBERG, C., u. M. KOBEL: *Biochem. Z.* **185**, 477 (1927).
- PAECH, K.: *Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe*. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1950. — PFENNIG, N.: *Arch. Mikrobiol.* **25**, 109 (1956). — PRINCIPE, P. A., and H. H. THORNBERRY: *Phytopathology* **42**, 123 (1952).
- RIPPEL-BALDES, A.: *Grundriß der Mikrobiologie*. 3. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- SANCHES-MARROQUIN, A., y L. ARCINIEGA: *Ciencia (Mexico, D.F.)* **13**, 151 (1953), zit. SPICHER, G. 1955. — SAUNDERS, A. P., and J. C. SYLVESTER: *Abst. Amer. Chem. Soc. Meeting, Chicago, III, Sept. 15—19*, p. 9 A—10 A, zit. SPICHER, G. 1955. — SCHÖBERL, A.: *Angew. Chem.* **21/22**, 227 (1940). — SMITH, L.: *J. of Biol. Chem.* **215**, 847 (1955). — SPICHER, G.: *Zbl. Bakter. II* **108**, 577 (1955).
- THOFERN, E.: mündl. Mitteilung (1957). — THORNBERRY, H. H.: *Phytopathology* **36**, 412 (1946); **38**, 26 (1948). — TISSIERES, A., and H. K. MITCHELL: *J. Biol. Chem.* **208**, 241 (1954).
- WAKSMAN, S. A.: *The Actinomycetes*. Waltham, Mass., USA, 230 pp. 1950. — WILLIAMS, A. M., and E. MCCOY: *Appl. Microbiol.* **1**, 307 (1953).

Die Wirkung hoher hydrostatischer Drücke auf Süßwasseralgen*

Von
GEORG STURM

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. April 1957)

In seinem Sammelreferat über die Wirkung des hydrostatischen Druckes auf biologische Objekte führt CATTELL (1936) an, daß die ältesten Versuche 1884 und 1891 von REGNARD an keimenden Samen ausgeführt worden sind.

Von größerer Bedeutung als diese doch recht isolierten Beobachtungen sind die Untersuchungen über den Druckeinfluß gegenüber Bakterien.

Zu erwähnen sind hier die älteren Arbeiten von CHLOPIN u. TAMMANN (1903); HITE, GIDDINGS u. WEAKLY (1914); LARSON, HARTZELL u. DIEHL (1918) sowie BASSET u. MACHEBOEUF (1932). HITE, GIDDINGS u. WEAKLY, deren Arbeit wohl die wichtigste ist, stellten unter anderem folgendes fest: 1. Für nicht sporenbildende Bakterien sind zur Abtötung Drücke zwischen 3000 und 6000 Atm. nötig; 2. die Sporenabtötung erfordert wesentlich höhere Drücke; 3. der Haupteffekt ergibt sich unmittelbar nach Beginn der Druckanwendung; die Zeitdauer der Kompression spielt nur in einem bestimmten kritischen Druckbereich eine Rolle; 4. die Wirkung auf Bakterien wird durch das Kulturmedium beeinflußt, ferner mag auch die Temperatur sowie die Geschwindigkeit der Kompression bzw. Druckwegnahme wichtig sein. Bezeichnend ist, daß bei gleich großen Drücken, wie sie zur Tötung von Bakterien notwendig sind, auch Eiweiß zu coagulieren beginnt (BRIDGMAN 1914).

Das Ziel der genannten Arbeiten war in jedem Fall die *Abtötung* der Bakterien, ein Effekt, der bei der angewandten Druckhöhe als physikalisch-chemisch bedingt bezeichnet werden darf. Die Bedeutung der Temperatur und der Zeit der Druckeinwirkung wurde dabei vielleicht nicht immer genügend berücksichtigt.

In neueren Arbeiten haben ZO-BELL mit JOHNSON (1949) und OPPENHEIMER (1950) die subletalen Wirkungen des hydrostatischen Druckes auf Bakterien studiert. Sie setzten verschiedene Meeres- und Bodenbakterien sowie etliche Hefearten bis zu vier Tage lang Drücken von 200—600 Atm. aus. Dadurch wurde das Wachstum fast aller untersuchten Arten behindert. ZO-BELL (1952, 1955) fand in einer Meerestiefe von 4000—10000 m barophile Formen, die sich nur bei 400—1000 Atm. optimal vermehrten. Aus Proben vom Philippinen Graben (10000 m) entwickelten sich bei 2,5° C und 1000 Atm. Druck 10—100mal mehr Bakterien als bei 30° C unter 1 Atm. In verschiedenen Fällen erfuhr die äußere Gestalt von Meeresbakterien durch Drücke von 400—600 Atm. eine Verlängerung. Niedrige Temperaturen verstärkten im allgemeinen die wachstumsverzögernde und abtötende Wirkung des Druckes; hingegen hob höhere Temperatur die Druckwirkung großteils auf.

* Auszug aus einer gleichlautenden Dissertation der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München.

Über die Wirkung des hydrostatischen Druckes auf Algen liegen bis jetzt noch keine modernen Angaben vor. Das Ziel dieser Arbeit ist deshalb, die Wirkung des hydrostatischen Druckes auf Süßwasseralgen, insbesondere auf ihre Vermehrung, zu untersuchen.

1. Material, Methodik und statistische Sicherung

1. Material. Für eine Druckeinwirkung über mehrere Tage eignete sich *Chlorella pyrenouloza* Chick besonders gut. Den Stamm erhielt ich freundlicherweise von Herrn Dr. O. KANDLER. Die Kultur erfolgte in einer von ihm angegebenen Nährlösung¹. Zum Studium des Zellgrößenwachstums wurde *Hydrodictyon* verwendet. Es kamen für eine Versuchsreihe nur Klone von einem Ausgangsnetz in Frage. Als Nährlösung diente eine 1:10 verdünnte Knop'sche Lösung, der bis zur leichten Gelbfärbung („Weinfarbe“) Erdbarkochung zugefügt worden war. Über sonst verwendetes Material finden sich Angaben bei den entsprechenden Abschnitten.

2. Methodik. Das in Nährlösung befindliche Untersuchungsmaterial wurde in Glasröhrchen mit einem lichten Durchmesser von 0,8 cm gefüllt. Danach wurden dieselben mit Zellstoffpfropfen verschlossen und in eine ebenfalls mit Nährlösung gefüllte Druckkammer aus Edelstahl gegeben. Diese stand durch ein Stahlrohr von 1 cm Außen- und 0,5 cm Innendurchmesser mit einer Öldruckpresse in Verbindung, durch welche der Druck übertragen wurde. Die Druckkammer hatte die Form eines Zylinders von 13 cm Höhe, 6 cm Außen- und 3,5 cm Innendurchmesser. Die Höhe des aufschraubbaren Deckels betrug 4,5 cm und sein Außendurchmesser 8 cm.

Grundsätzlich wurde jede Versuchsprobe auf eine Kontrollprobe bezogen, die während der Dauer der Druckeinwirkung unter gleicher Temperatur im Dunkeln gehalten wurde.

Bei den *Chlorella*-Versuchen wurde vor Versuchsbeginn die Populationsdichte der verwendeten Algensuspension durch zweimaliges Auszählen von 15 Hämacytometerquadraten ermittelt. Dann wurde in geeichte Röhrchen jeweils die gleiche Menge Algenmaterial pipettiert. Bei der Auszählung wurde immer auf eine homogene Suspension geachtet, sowie darauf, daß die Röhrchen bis zum Eichstrich aufgefüllt waren.

Soweit nötig, finden sich nähere Hinweise zur Methodik bei den betreffenden Abschnitten.

3. Statistische Sicherung. Es wurde das sogenannte *T*-Verfahren angewandt. Aus den ermittelten *t*-Werten wurde nach einer Tafel von PÄTAU der *P*-Wert bestimmt. Dabei gibt *P* die Wahrscheinlichkeit dafür an, daß zufällig eine mindestens so große Differenz wie die beobachtete bei zwei miteinander zu vergleichenden Messungsreihen auftritt. *P*-Werte von 0,01–0,0028 weisen auf eine schwache Sicherung hin. Erreicht *P* 0,0027 oder kleinere Werte, dann gilt die Differenz der miteinander zu vergleichenden Mittelwerte als gut gesichert. Kein Vorzeichen bedeutet, daß die Versuchsprobe gefördert, ein negatives, daß sie gehemmt wurde. Werte unter 0,0002 wurden der Einfachheit halber nicht mehr gesondert angegeben. Der Wert 0,0002 kann also auch bedeuten, daß *P* kleiner als 0,0002 ist.

¹ Siehe Z. Naturforsch. 5b, 424 (1950).

II. Versuchsreihen mit *Chlorella pyrenoidosa*

I. Langanhaltende Druckeinwirkung

Da in verschiedenen Vorversuchen bei kurzer Einwirkungsdauer eine Druckwirkung nicht zu erkennen war, ließ ich in den folgenden Versuchen die Drücke 10—13 Tage einwirken. Dabei wurden zwei Ziele verfolgt:

a) Es sollte festgestellt werden, ob die lange Druckeinwirkung unmittelbar zu einer Deformation oder zum Absterben der Algen führt. Sofort nach Entnahme aus der Druckkammer wurden deshalb 1 bis 3 Proben mikroskopisch genau untersucht und mit einem Hämacytometer ausgezählt.

b) Da die Algen während der Druckeinwirkung im Dunkeln waren und so ein Vermehrungsstillstand erwartet werden mußte, wurden die Proben nach der Druckwegnahme dem Tageslicht ausgesetzt. Mit den Kontrollproben wurde genau so verfahren. In bestimmten Zeitabständen wurden jeweils eine Versuchs- und Kontrollprobe mikroskopisch untersucht und ausgezählt. So bestand die Möglichkeit, durch Druckeinwirkung induzierte, erst später in der Wachstumsperiode auftretende Effekte zu verfolgen.

A. 100 Atm. Druck (Tab. 1)

Dauer der Druckwirkung 10 Tage. Die Temperatur schwankte zwischen 17,5° und 18° C.

Tabelle 1

Die Spalte „Lichteinwirkung in Tagen“ gibt die Zeit an, während der die betreffende Probe — im Anschluß an die, durch die Druckeinwirkung bedingte, Dunkelperiode — dem Tageslicht ausgesetzt war. Der unter der Rubrik „Algenzahl je Hämacytometerquadrat“ („Algenzahl je Häm.“) stehende Wert stellt den Mittelwert aus 15 Einzelmessungen dar. Die „Vermehrung in Prozent“ bezieht sich auf die Ausgangspopulation, die gleich 100% gesetzt wurde. „P“ gibt den Grad der statistischen Sicherung an¹.

Ausgangspopulation: 55,3 Algen/Hämacytometerquadrat.

Probennummer	Lichteinwirkung in Tagen	Algenzahl je Häm.	Vermehrung in %	P	Probennummer	Lichteinwirkung in Tagen	Algenzahl je Häm.	Vermehrung in %	P
Kontrolle	1	0	59,8	2,89	Versuch	1	0	43,0	— 11,03
	2	0	57,8			2	0	54,2	
	3	0	52,8			3	0	47,1	
	4	11	54,67	— 1,12		4	11	54,47	— 1,50
	5	28	68,20	23,33		5	28	89,07	61,07
									0,0002
									— 0,95
									0,0002

¹ Die Erklärung gilt auch für die übrigen Tabellen.

B. 200 Atm. Druck (Tab. 2)

Dauer der Druckeinwirkung 12 Tage und 22 Std. Die Temperatur schwankte zwischen 17,5° und 19° C.

Tabelle 2

Ausgangspopulation: $\left. \begin{matrix} 19,27 \\ 19,60 \end{matrix} \right\} 19,435$ Algen/Hämacytometerquadrat

Proben-nummer	Lichteinwirkung in Tagen	Algenzahl je Häm.	Ver-mehrung in %	P	Proben-nummer	Lichteinwirkung in Tagen	Algenzahl je Häm.	Ver-mehrung in %	P
Kontrolle	1	0	19,00	— 5,98	Versuch	1	0	17,93	— 3,74
			18,67					18,60	
	2	0	17,60			2	0	18,47	
			17,56					17,98	
	3	0	18,33			3	0	18,99	
			18,33					18,87	
4	15	31,27	30,000	54,40	4	15	50,00	50,500	159,84
		29,73					51,00		
5	30	72,87	73,335	277,33	5	30	96,87	96,400	396,01
		73,80					95,93		

C. 300 Atm. Druck (Tab. 3)

Dauer der Druckeinwirkung 13 Tage. Die Temperatur schwankte zwischen 19° und 21° C.

Tabelle 3

Ausgangspopulation: $\left. \begin{matrix} 24,67 \\ 24,33 \end{matrix} \right\} 24,50$ Algen/Hämacytometerquadrat

Proben-nummer	Lichteinwirkung in Tagen	Algenzahl je Häm.	Ver-mehrung in %	P	Proben-nummer	Lichteinwirkung in Tagen	Algenzahl je Häm.	Ver-mehrung in %	P
Kontrolle	1	0	25,07	2,45	Versuch	1	0	23,87	— 2,04
			25,13					24,13	
	2	10	37,60			2	10	30,87	
			37,47					31,20	
	3	20	59,13			3	20	51,67	
			58,40					50,73	
			58,765	139,86				51,20	108,98
4	30	66,73	66,50	171,43	4	30	52,93	53,165	117,00
		66,27					53,40		

D. 400 Atm. Druck (Tab. 4)

Dauer der Druckeinwirkung 13 Tage. Die Temperatur schwankte zwischen 19° und 21° C.

Tabelle 4

Ausgangspopulation: $\left. \begin{matrix} 13,80 \\ 13,40 \end{matrix} \right\} 13,60$ Algen/Hämacytometerquadrat

Proben-num-mer	Licht-ein-wirkung in Tagen	Algenzahl je Häm.	Ver-mehrung in %	P	Proben-num-mer	Licht-ein-wirkung in Tagen	Algenzahl je Häm.	Ver-mehrung in %	P			
Kontrolle	1	0	12,74} 12,47}	12,605	— 7,32	Versuch	1	0	12,07} 12,00}	12,035	— 11,51	— 0,27
	2	5	13,07} 13,40}	13,235	— 2,68		2	5	9,67} 9,80}	9,735	— 28,42	— 0,0002
	3	10	28,00} 27,67}	27,835	104,67		3	10	14,60} 14,33}	14,465	6,36	— 0,0002
	4	15	39,27} 39,87}	39,57	190,96		4	15	21,00} 20,53}	20,765	52,68	— 0,0002
	5	20	44,40} 44,27}	44,335	225,99		5	20	18,53} 18,47}	18,50	36,03	— 0,0002
	6	25	54,27} 54,20}	54,235	298,79		6	25	25,80} 25,60}	25,70	88,97	— 0,0002
	7	30	65,73} 64,80}	65,265	379,89		7	30	34,87} 34,47}	34,67	154,93	— 0,0002

Ergebnis: Die lange Druckeinwirkung von 10 bzw. 13 Tagen hatte die Algen weder deformiert noch zerstört. Das Wachstum war zwar eingestellt worden, der Kontrollversuch zeigte aber, daß dies lediglich auf die Dunkelheit in der Stahlkammer zurückzuführen war.

Erst nachdem die Algen wieder dem Tageslicht ausgesetzt worden waren, ergab sich, daß die Drücke von 100—200 Atm. eine Förderung der Vermehrung bewirkten; noch stärkerer Druck von 300 bzw. 400 Atm. bedingte jedoch ein Absinken der Vermehrungsrate (Abb. 1).

2. Kurze Druckeinwirkung: Dauer 5 Std

Die bisherigen Versuche haben ergeben, daß lang anhaltende Druckeinwirkung bei *Chlorella pyrenoidosa* die Vermehrungsgeschwindigkeit zu beeinflussen vermag. Die nachfolgenden Versuche sollen nun die Frage klären, ob und wie weit die erzielten Effekte neben der Druckhöhe auch von der Druckeinwirkungsdauer abhängig sind. Dazu wurden die Algen 5 Std lang verschieden hohen Drücken unterworfen und anschließend dem Tageslicht ausgesetzt.

Ergebnis: Die nur 5stündige Druckeinwirkung bewies, daß der erzielte Effekt neben der Druckhöhe wesentlich von der Druckeinwirkungsdauer abhängig ist. So ergaben 200 *Atm.*, die bei 13tägiger Einwirkung eine deutliche Vermehrungsförderung verursachten, noch *keine Veränderung*.

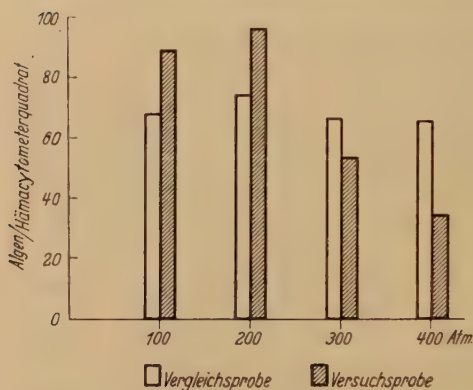


Abb. 1. Algenanzahl je Hämacytometerquadrat nach 30tägiger (bei 100 *Atm.* nach 28tägiger) Lichteinwirkung

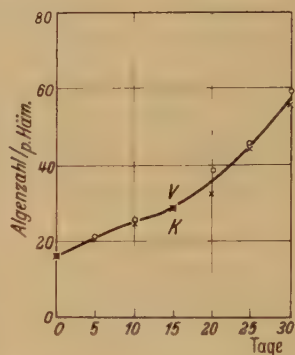


Abb. 2. A 200 *Atm.* Druck. o—o Versuchs-(V), x—x Kontrollprobe (K) (gilt für die Abb. 2 bis 6)

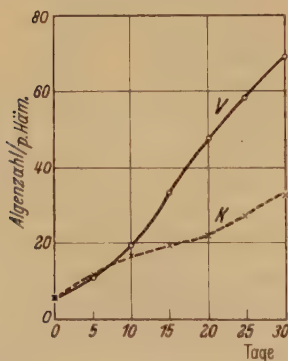


Abb. 3. B 300 *Atm.* Druck

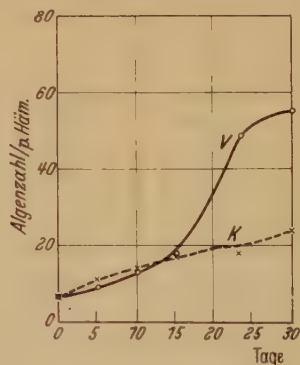


Abb. 4. C 400 *Atm.* Druck

Erst Drücke von 300—500 *Atm.*, die bei langer Einwirkung hemmend wirkten, hatten hier eine stark ausgeprägte Steigerung der Vermehrungsrate zur Folge (Abb. 3—5).

Beim Studium der Kurven (Abb. 3—5) fällt ferner auf, daß sich die fördernde Druckwirkung erst nach einer „Anlaufzeit“ bemerkbar macht, und bei 500 *Atm.* (Abb. 6) finden wir nach 5tägiger Lichteinwirkung sogar eine statistisch gesicherte Vermehrungshemmung. Deshalb möchte ich annehmen, daß sich die Druckwirkung aus zwei Komponenten zusammensetzt.

Die eine davon ist von der zugeführten Reizmenge (dem Produkt aus Druckhöhe und Einwirkungsdauer) abhängig und wirkt auf die Vermehrung zuerst stimulierend, nach Überschreiten eines Grenzwertes aber schädigend ein. Die zweite wird hauptsächlich durch die Druckhöhe bestimmt und hat eine, zumindest bis zu einer bestimmten Druckhöhe, reversible Schädigung zur Folge.

Das Ausbleiben der auch im Anfangsstadium zu erwartenden Förderung ließe sich so durch die entgegengesetzt wirkenden, hier gleich starken, Kräfte der zwei Komponenten erklären.

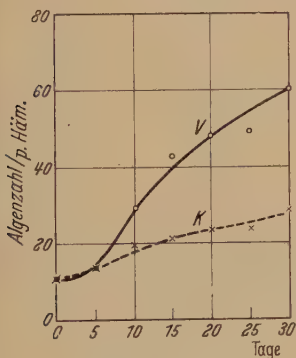


Abb. 5

Abb. 5. D 400 Atm. Druck (Wiederholungsversuch)

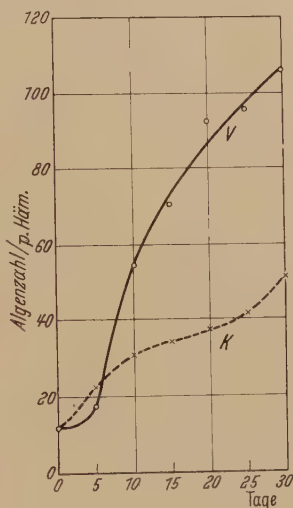


Abb. 6

Abb. 6. E 500 Atm. Druck. Bei 500 Atm. liegt die Grenze der Öldruckpresse. Begreiflicherweise traten deshalb Schwankungen zwischen 485 und 510 Atm. auf. Sie wurden laufend korrigiert

Die Vermehrungshemmung bei 500 Atm. liegt in dem Überwiegen der schädigenden Komponente begründet, und erst nach deren Abbau tritt die Förderung zutage.

3. 5stündige Druckeinwirkung in Abhängigkeit vom p_H -Wert

Methodik: Die Bestimmung der Populationsdichte der Algensuspension erfolgte mit einem Photometer. Zur Eichung wurde von einer ziemlich konzentrierten Algensuspension durch Hämacytometerzählungen die Populationsdichte ermittelt. Von dieser Stammlösung ausgehend wurden Verdünnungen von jeweils bekannter Populationsdichte hergestellt. Mit dem PULFRICH-Photometer wurden nun die Extinktionen der betreffenden Suspensionen gemessen. Die in einer Kurve zusammengefaßten Punkte ergaben eine Gerade. Der Umrechnungsfaktor betrug 218. Extinktionswert $\cdot 218 =$ Populationsdichte. Die Populationsdichte gibt dabei — wie bei den vorherigen Versuchen — die auf ein Hämacytometerquadrat treffende Algenanzahl an. Für die Messungen kam das Filter S 47 zur Verwendung. Es hat ein Durchlässigkeitsmaximum von 4580 Å und seinen wirksamen Filterschwerpunkt bei 4650 Å.

Das gewünschte p_H -Milieu wurde durch Zusatz von HCl bzw. KOH zur Nährlösung erzielt. Durch die genannten Reagentien kamen also keine neuen Ionen in die Nährlösung. Die Bestimmung des p_H -Wertes erfolgte mit Chinhydron-Wasserstoff-Antimon-Elektrodenketten.

Vor Versuchsbeginn wurde eine konzentrierte Algensuspension in das gewünschte p_H -Milieu gebracht. Die entsprechenden Vergleichsproben wurden (abgesehen von der Druckeinwirkung) den gleichen Bedingungen unterworfen. Nach Beendigung der Druckeinwirkung wurden die Algen der Versuchs- und Vergleichsproben bei 4000 U/min 4 min lang abzentrifugiert. Dann wurden die Algen in normale Nährlösungen mit einem p_H -Wert von 6,5 gebracht.

Versuchs- und Vergleichskulturen wurden nun in der Weise mit Nährlösung verdünnt, daß beide genau den gleichen Ausgangsextinktionswert erreichten. Diese Algensuspensionen wurden auf je 3 (in einigen Fällen auf 4) Erlenmeyerkolben von 100 cm³ verteilt und darin im Tageslicht weiterkultiviert.

Die angegebenen Werte stellen den Mittelwert aus 3 bzw. 4 Kolben dar. Die für eine Einzelprobe erhaltene Zahl entspricht dem Mittelwert aus 5, bei stärker abweichenden Werten aus mehreren, Messungen.

Versuche: Die Beobachtungsdauer der Algen betrug mindestens 25 Tage. Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt:

A. 400 Atm. Druck. p_H -Wert 3, 4, 5, 6, 6,5 (entspricht der normalen Nährlösung), 7,5 und 8.

B. 200 Atm. Druck. p_H -Wert 4, 6 und 8.

Ergebnis: Wie im Abschnitt „Methodik“ bereits erwähnt wurde, befanden sich bei diesen Untersuchungen Vergleichs- und Versuchskulturen jeweils im gleichen p_H -Milieu.

Es sollte also nicht der direkte Einfluß des p_H -Wertes untersucht, sondern die Frage geklärt werden, ob die Druckwirkung durch den veränderten p_H -Wert beeinflußt wird. Zudem war die Einwirkungsdauer des veränderten p_H -Wertes so gering gehalten (wenig über 5 Std), daß kaum Nachwirkungen zu erwarten waren.

Bei 5stündiger Einwirkung von 200 Atm. war die Druckwirkung so schwach, daß auch ein veränderter p_H -Wert keinen deutlichen Einfluß erkennen ließ; obschon sich bei p_H 4 eine minimale Förderung der Vermehrung zeigte.

Eine 5stündige Druckeinwirkung von 400 Atm. induzierte bei dem optimalen p_H -Wert von 6,5 eine deutliche Vermehrungssteigerung. Im extrem sauren Bereich (3) wurde die Vermehrungssteigerung nicht nur aufgehoben, sondern in eine Hemmung umgekehrt. Bereits bei einem p_H -Wert von 4 war eine ganz schwache Steigerung der Vermehrung zu verzeichnen, die aber längst nicht so stark war wie bei p_H -Werten von 5, 6 oder gar 6,5. Beim Überwecheln in den alkalischen Bereich wurde die Vermehrungsförderung wieder aufgehoben und konnte bei den p_H -Werten 7,5—8 schon nicht mehr festgestellt werden (s. Tab. 5 und Abb. 7).

Da extremer p_H -Wert ebenso wie längere Druckeinwirkung (s. S. 113) an Stelle der Vermehrungsförderung eine Hemmung bewirkt, muß vermutet werden, daß ein *ungünstiges* p_H -Milieu die Druckwirkung verstärkt.

Wie die Druckwirkung durch den p_H -Wert beeinflußt wird, ist noch unklar, vielleicht spielt der isoelektrische Punkt dabei eine Rolle.

Tab. 5 zeigt die nach 25 tägiger Lichteinwirkung bei 5stündiger Druckeinwirkung von 400 Atm. gewonnenen Werte.

Tabelle 5

1 = Ausgangspopulation in Algen/Hämacytometerquadrat, 2 = Population der Vergleichsprobe nach 25 Tagen in Algen/Hämacytometerquadrat, 3 = Population der Versuchsprobe nach 25 Tagen in Algen/Hämacytometerquadrat, 4 = 100% gesetzte Ausgangspopulation, 5 = Zunahme der Vergleichsprobe nach 25 Tagen in Prozent, bezogen auf die Ausgangspopulation, 6 = Zunahme der Versuchsprobe nach 25 Tagen in Prozent, bezogen auf die Ausgangspopulation, 7 = Differenz der Zunahme der Vergleichs- und Versuchsprobe in Prozent

pH	1	2	3	4	5	6	7
3	19,6	86,1	77,9	100	339	297	- 42
4	23,1	84,1	87,2	100	264	277	+ 13
5	21,8	97,7	110,1	100	348	405	+ 57
6	18,9	84,0	100,0	100	344	429	+ 85
6,5	22,9	71,5	93,0	100	212	306	+ 94
7,5	20,1	98,0	106,0	100	388	427	+ 39
8	24,0	103,0	94,0	100	329	292	- 37

In Abb. 7 wurden die Vergleichsproben gleich 0 gesetzt, die Kurve ergibt sich aus den unter der Spalte 7 stehenden Werten der Tab. 5.

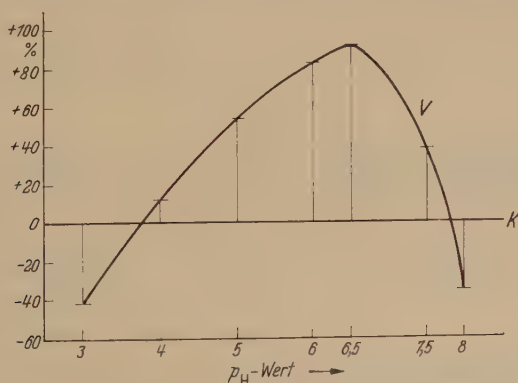


Abb. 7. p_H -Abhängigkeit der Vermehrungsförderung bzw. -hemmung bei 5stündiger Druckeinwirkung von 400 Atm.

III. Versuche mit Hydrodictyon

In den folgenden Versuchsreihen wurde der Einfluß des hydrostatischen Druckes auf das Zellängenwachstum bei *Hydrodictyon reticulatum* (L.) verfolgt.

NEEB (1952) unterwarf die Algen intermittierender Belichtung und stellte dabei fest, daß sie nur bei Belichtung wachsen, während sie in der Dunkelheit sehr rasch ihre Zellvergrößerung einstellen.

Dies gab Anlaß, in der Versuchsreihe 1 zu prüfen, inwieweit es von Bedeutung ist, ob die Druckeinwirkung in der Wachstumsphase (bei Tage) oder während des Wachstumsstillstandes (bei Nacht) erfolgt.

Methodik. Es wurde jeweils ein Netz, nachdem es ausgemessen war, in der Mitte quer durchgeschnitten und die eine Hälfte zur Vergleichs-, die andere zur Versuchskultur verwendet. Die Verletzung hat nach NEEB keine Beeinträchtigung des Netzwachstums zur Folge.

Es wurden nur relativ junge, gleichmäßig gewachsene Netze von zylindrischer Gestalt verwendet. Das Ausmessen erfolgte, indem die Zellen von einem Netze bis zum anderen durchgemessen wurden. Die angeführten Mittelwerte wurden immer aus 30 Einzelmessungen gewonnen.

Die Zelllänge ist in Mikrometerteilstrichen angegeben (ein Teilstrich = $10,2 \mu$).

1. 5stündige Druckeinwirkung in der Belichtungs- und in der Dunkelphase

Drücke von 100, 200 und 400 Atm. wurden sowohl in der Licht- als auch in der Dunkelphase angewandt. Nach der Druckeinwirkung wurden die Algen mindestens 15 Tage beobachtet.

Ergebnis: 5stündige Druckeinwirkung führte in der Belichtungsphase lediglich bei 200 Atm. zu einer schwachen Wachstumsförderung. Auch in der Dunkelphase zeigte sich bei 200 Atm. eine geringe Wachstumsförderung; die hier jedoch auch noch bei 400 Atm. gerade festgestellt werden konnte. Die Förderung erstreckte sich also in der Dunkelphase über einen größeren Druckbereich. Bemerkenswert ist, daß sich in der Dunkelphase bei 100 Atm. eine zwar minimale, aber statistisch teilweise zu

Tabelle 6

100 Atm. Druck, Einwirkungszeit von 22.10 Uhr bis 3.10 Uhr.
Ausgangsmessungen: Netz 1: 2,63, Netz 2: 2,70 Mikrometerteilstriche

Netznummer	Lichteinwirkung in Tagen	Mittelwert Mikrometerteilstriche	Zunahme der Zelllänge %	P	Netznummer	Lichteinwirkung in Tagen	Mittelwert Mikrometerteilstriche	Zunahme der Zelllänge %	P
Kontrolle					Versuch				
1	15	40,03	37,40	1422,1	1	15	36,60	33,97	1291,6 — 0,0025
2	15	24,40	21,70	803,7	2	15	21,93	19,23	712,2 — 0,0007

sichernde Wachstumshemmung ergab (s. Tab. 6). Die Erklärung möchte ich, ähnlich wie bei *Chlorella pyrenoidosa*, in dem Zusammenwirken zweier verschiedener Komponenten der Druckwirkung suchen (s. S. 114). Bei 100 Atm. tritt in der Belichtungsphase keine nachweisbare Druckwirkung auf. Auch in der Dunkelphase tritt bei 100 Atm. noch keine Förderung ein, doch ist die schädigende — hier irreversible — Komponente bereits ausgeprägt. Die im Gegensatz zu *Chlorella pyrenoidosa*

so minimale Wachstumsförderung dürfte vielleicht ebenfalls ihren Grund in der hier wesentlich stärker und irreversibel wirkenden schädigenden Komponente des Druckeffektes haben.

2. 26stündige Druckeinwirkung

Druckhöhe 400 Atm. Temperatur 18° C

Tab. 7 zeigt deutlich den schädigenden Einfluß einer Druckhöhe von 400 Atm. nach 14tägiger Belichtung. Die beobachteten Unterschiede zwischen Vergleichs- und Versuchsnetz sind mit $P < 0,0002$ sehr gut gesichert.

Tabelle 7

Ausgangsmessungen: Netz 1 : 3,30, Netz 2 : 4,93, Netz 3 : 3,70,
Netz 4 : 4, 37 Mikrometerteilstriche

Netznummer	Lichteinwirkung in Tagen	Mittelwert Mikrometer-teilstreiche		Zunahme der Zelllänge %	P	Netznummer	Lichteinwirkung in Tagen	Mittelwert Mikrometer-teilstreiche		Zunahme der Zelllänge %	P	
Kontrolle	1	14	37,13	33,83	1025,2	Versuch	1	14	21,60	21,30	645,5	— 0,0002
	2	14	35,87	30,94	627,6		2	14	21,53	16,60	336,7	— 0,0002
	3	14	36,07	32,37	874,9		3	14	25,10	21,40	578,4	— 0,0002
	4	14	37,63	33,26	761,1		4	14	21,37	17,67	404,3	— 0,0002

3. 5stündige Druckeinwirkung bei 0° C

ZO-BELL fand bei Bakterien, daß niedrigere Temperaturen die schädigende Druckwirkung verstärken.

JOHNSON u. EYRING führen die Hauptursache der Druckwirkung auf die Volumenänderung zurück. Diese wird durch den Kompressibilitätskoeffizienten ausgedrückt und hängt von der Temperatur ab. Er beträgt z. B. bei 1—100 Atm. für 0° C 511, für 20° C 468; bei 100—200 Atm. für 0° C 492 und für 20° C 442 (aus LANDOLT-BÖRNSTEIN, Bd. I, S. 100; 1923).

Aus diesen Gründen führte ich mit *Hydrodictyon* eine Versuchsreihe bei tiefer Temperatur durch.

Versuch: Druckhöhe 200 Atm.

Die Temperatur betrug fast genau 0° C. Sie wurde durch Vereisen der Druckkammer mit CO₂ erzielt. Die Vergleichskulturen befanden sich inzwischen bei gleicher Temperatur im Eisschrank.

Ergebnis: 5stündige Druckeinwirkung hatte bei 200 Atm. und einer Temperatur von 0° C eine klar abzusichernde Wachstumshemmung der Versuchskulturen zur Folge (s. Tab. 8).

Sehr schön zeigt das die Säulenskizze (Netzlänge) der Kontroll- und Versuchsalgen bei 20° und 0° C in Abb. 8: bei 20° C schwache Förderung der Druckwirkung, bei 0° C eindeutige Hemmung. Die Lichteinwirkung betrug 15 Tage.

Tabelle 8

200 Atm. Druck, 5 Std Einwirkungsdauer bei 0°C. Ausgangsmessung: Netz 1: 3,53,
Netz 2: 4,40, Netz 3: 3,50, Netz 4: 4,77 Mikrometerteilstriche

Netznummer	Licht- ein- wirkung in Tagen	Mittelwert Mikrometer- teilstreiche	Zu- nahme der Zelllänge %	P	Netznummer	Licht- ein- wirkung in Tagen	Mittelwert Mikrometer- teilstreiche	Zu- nahme der Zelllänge %	P		
Kontrolle	1	5	8,63	5,10	144,5	Versuch	5	7,87	4,34	122,9	—0,0015
		10	26,43	22,90	648,7		10	18,40	14,87	421,2	—0,0002
		15	61,48	57,95	1641,6		15	35,79	32,26	913,9	—0,0002
	2	5	13,03	8,53	189,6		5	11,43	6,93	154,0	—0,0002
		10	37,60	33,10	735,6		10	27,23	22,73	505,1	—0,0002
		15	68,44	63,94	1420,9		15	46,98	42,48	944,0	—0,0002
	3	5	10,30	6,80	194,3		5	9,67	6,17	176,3	—0,015
		10	29,37	25,87	739,1		10	22,97	19,47	556,3	—0,0002
		15	61,89	58,39	1668,3		15	46,40	42,90	1225,7	—0,0002
	4	5	16,30	11,53	241,7		5	12,47	7,70	161,4	—0,0002
		10	47,70	42,93	900,0		10	27,33	22,56	473,0	—0,0002
		15	124,12	119,35	2502,1		15	71,51	66,74	1399,1	—0,0002

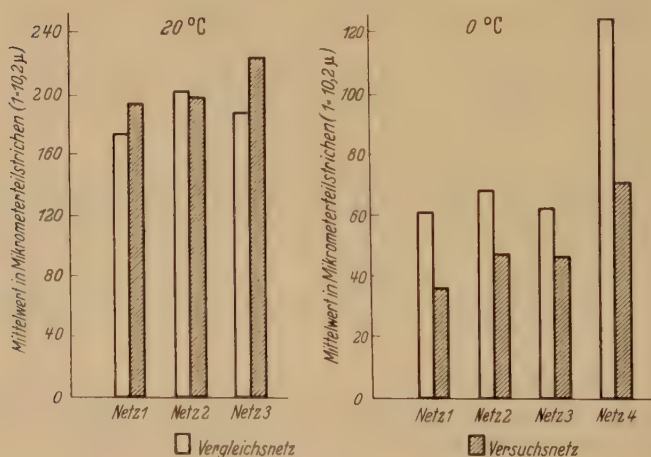


Abb. 8. 5stündige Druckeinwirkung von 200 Atm. bei 20°C und 0°C

IV. Versuche mit geringem Überdruck

Den Einfluß geringen Überdruckes auf submerse Wasserpflanzen hat FERLING (1957) geprüft. Deshalb wurde untersucht, ob auch bei unseren Algen niedere hydrostatische Drücke, wie sie von ökologischer Bedeutung sind, auf die Vermehrung bzw. auf das Wachstum Einfluß haben.

Als Untersuchungsmaterial dienten *Chlorella pyrenoidosa* und *Hydrodictyon reticulatum*. Die Algen befanden sich in mit Nährlösung gefüllten Glasröhrchen, die mit Zellstoff leicht verschlossen waren. Diese standen in ebenfalls mit Nährlösung gefüllten starkwandigen Glasflaschen. Der Druck wurde durch eine Quecksilbersäule erzeugt. Jeder Versuchsprobe entsprach auch hier eine Kontrollprobe.

Versuche: 1. 0,9 atü. Einwirkungsdauer 12 Tage. Versuchsobjekt: *Hydrodictyon*.
2. 2 atü. Einwirkungsdauer 10 Tage. Versuchsobjekt: *Chlorella* und *Hydrodictyon*.

Eine Wirkung der niedrigen Überdrücke ließ sich nicht feststellen.

V. Versuche mit anderen Algen

1. *Zygnema spec.*

3stündige Druckeinwirkung von 400 Atm. war ohne Einfluß auf Zelllänge und Zelldicke, jedoch wird das Fadenwachstum bzw. die Teilungsgeschwindigkeit durch den Druck anscheinend gefördert; doch zeigte die angewendete Methode zu große Ungenauigkeiten, um weitergehende Schlüsse zu ziehen.

2. *Desmidiaceen*

Als Material diene eine Desmidiaceen-Mischkultur. Durch die Versuche sollten gegebenenfalls auftretende Veränderungen der Zellmembranstruktur festgestellt werden. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte deshalb mit Ölimmersion sowie zur Sichtbarmachung der Gallerthülle als Tuschepräparat. Auszählungen zur Beurteilung der Vermehrungsrate wurden nicht unternommen. Die Algen wurden nach der Druckeinwirkung in bestimmten Zeitabständen untersucht.

Durchgeführt wurden Versuchsreihen bei 400 Atm. Druck, 18° C und 5 bzw. 26 Std Einwirkungsdauer; ferner bei 200 Atm. Druck, 0° C und einer 5stündigen Einwirkungsdauer.

An der Membranstruktur konnten dabei in keinem Fall Veränderungen beobachtet werden.

3. *Außerordentlich verstärkte Vermehrung einer Cryptomonade durch Druckeinwirkung*

Bei den *Chlorella*-Versuchen fiel auf, daß in den Versuchsproben, die einer 5stündigen Druckeinwirkung von 300—500 Atm. ausgesetzt waren, bei der ersten Messung nach 5 Tagen Lichtzutritt regelmäßig kleine, farblose, metabolische, nicht näher bestimmbare Cryptomonaden auftraten, die nach weiteren 5 Tagen Belichtung fast vollständig verschwunden waren.

Bei einer Auszählung ergaben sich bei einem Versuch mit 5stündiger Druckeinwirkung von 400 Atm. in 128 Hämacytometerquadraten in der Vergleichsprobe 6 (= 0,047/Quadrat), in der Versuchsprobe 687 (= 5,37/Quadrat) Cryptomonaden.

Offenbar war also die rapid gesteigerte Vermehrung erst durch die Einwirkung des hydrostatischen Druckes induziert worden.

VI. Diskussion

Bei dem Versuch, die Druckeinwirkung auf pflanzliche Organismen zu analysieren, stoßen wir auf drei große Wirkungsbereiche des hydrostatischen Druckes.

1. Submerse höhere Wasserpflanzen dienten GESSNER (1952) und insbesondere FERLING (s. S. 120) als Untersuchungsobjekte für einen Druck von 1—2 atü. Die Autoren vermuten, daß die erzielten Effekte (Beeinflussung des Größenwachstums, Hemmung der Organdifferenzierung, usw.) weitgehend durch Veränderungen der Interzellulargase bedingt seien.

2. Eine Druckhöhe bis zu 500 Atm. zeitigt aber, wie JOHNSON u. EYRING (1948) annehmen, „gänzlich andere Wirkungen“. Dafür spricht meines Erachtens auch die große Rolle, die hier die Einwirkungsdauer im Gegensatz zu untenstehenden Arbeiten (Drücke von etwa 10000 Atm.) spielt.

Ein Vergleich mit den von ZO-BELL u. Mitarb. untersuchten Druckwirkungen bis zu 600 Atm. auf Bakterien ist nur bedingt zulässig, da nach BRIDGMAN (1926, 1931) der erzielte Druckeffekt in direkter Beziehung zur Molekülstruktur steht.

3. Relativ zahlreiche Untersuchungen über den Einfluß von ungefähr 10000 Atm. auf die Denaturierung von Proteinen, die Abtötung von Bakterien, die Inaktivierung von Enzymen usw. (BASSET u. MACHEBOEUF 1932, CATTEL 1936, BRIDGMAN 1946) lassen den Schluß zu, daß die Wirkung, analog der recht ähnlichen Hitzecoagulation von Eiweiß, auf einer groben Veränderung der Molekülstruktur beruht.

Die vorliegende Arbeit erstreckt sich hauptsächlich auf den Bereich von 100—500 Atm. Es soll zunächst erörtert werden, welche Faktoren durch den hydrostatischen Druck beeinflusst werden.

An erster Stelle sei der Kompressibilitätskoeffizient von Wasser genannt, der bei steigendem Druck und bei steigender Temperatur abnimmt (s. S. 119). Hingegen ist die Bedeutung der Salzkonzentration (Nährlösung) bei Süßwasseralgen so minimal, daß sie außer Acht gelassen werden kann.

Weit über die Volumenverminderung hinaus wirkt der Druck auf das Gleichgewicht und die *Reaktionsgeschwindigkeit* vieler chemischer Prozesse ein (FANICETT u. GIBSON aus: CATTEL 1936). Die beobachteten Effekte können also auf Änderungen im Sol-Gel-System, im Redox-System, in der Viscosität, die ebenfalls durch Druck beeinflusst wird, sowie in Enzymreaktionen beruhen.

Nach Arbeiten von ZO-BELL (S. 109) und nach eigenen Beobachtungen (S. 119) hat die Temperatur einen großen Einfluß auf die Druckwirkung; erhöhte Temperatur mindert sie, niedrige verstärkt sie. Der Grund ist

in der antagonistischen Wirkung von Druck und Temperatur auf die Molekülbeweglichkeit zu suchen. In Harmonie damit steht die Auffassung von JOHNSON u. EYRING, die die Hauptursache der Druckwirkung in einer Volumenänderung sehen.

Das p_H -Milieu scheint, vom Optimum (p_H -Wert 6,5) ausgehend, mit Zunahme der Acidität und Basizität auf den Druckeffekt verstärkend zu wirken (S. 116).

Unklar ist, an welcher Stelle die Druckwirkung angreift. GESSNER (1955) vermutet, daß es eventuell das Apoenzym ist, das durch Druck Veränderungen erfährt. Die von ZO-BELL sogenannten „barophilen“ Organismen — er versteht darunter Organismen, in seinem Falle Meeresbakterien, die unter hohem Druck wesentlich besser als unter Normaldruck gedeihen — ließen sich dann eventuell durch die Entstehung besonders stabiler Eiweißmoleküle erklären. Auch das Verhalten der auf S. 121 erwähnten Cryptomonade dürfte hierher gehören. Sicher ist lediglich, daß wir bei der Kompliziertheit der Wechselwirkungen nicht berechtigt sind, einen Einzelfaktor herauszugreifen und auf ihn die — wahrscheinlich inhomogene — Druckwirkung (S. 114) zurückzuführen.

Grundsätzlich müssen Zeitdauer und Druckhöhe in direkte Beziehung zueinander gebracht werden. Beide zusammen ergeben eine Reizmenge, die nach Überschreiten der Reizschwelle je nach Stärke zuerst stimulierend und dann hemmend wirkt. Bei welcher Reizmenge das fördernde oder das hemmende Stadium beginnt, hängt ebenso wie die Stärke des erzielten Effektes von der Organisationshöhe und der physiologischen Widerstandsfähigkeit der betreffenden Alge ab.

So interessant die Einwirkung hoher hydrostatischer Drücke auf Süßwasseralgen vom physiologischen Standpunkt aus sein mag, ökologisch ist sie von keiner direkten Bedeutung. Wichtig wäre zu wissen, wie weit Meeresalgen auf Druck ansprechen; leider fehlen darüber bis jetzt Untersuchungen. Gegenüber dem Licht dürfte aber auch hier der Druck als den Lebensraum begrenzender Faktor zurücktreten, obschon seine Bedeutung nicht völlig abgestritten werden kann.

Für die Themastellung und viele Anregungen möchte ich Herrn Professor GESSNER meinen herzlichen Dank sagen. Den Direktoren des Botanischen Institutes, München, Herrn Professor RENNER und seinem Nachfolger, Herrn Professor BRAUNER bin ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes zu Dank verpflichtet.

Zusammenfassung

1. Bei *Chlorella pyrenoidosa* Chick induziert eine Druckeinwirkung von 10 bzw. 13 Tagen eine Vermehrung der Zellteilungen, die bei 200 Atm. wesentlich deutlicher ist als bei 100 Atm. Drücke zwischen 300 und 400 Atm. dagegen bedingen ein deutliches Absinken der Vermehrungsrate.

2. Eine 5stündige Druckeinwirkung von 200 Atm. bleibt ohne Einfluß, eine solche von 300—500 Atm. hat zunächst ein Absinken der Vermehrungsrate zur Folge, welche jedoch nach etwa 10 Tagen in das Gegenteil umschlägt und zu einer starken Steigerung der Zellteilungsfähigkeit führt. Es ist somit eine deutliche Spätwirkung auch des kurzfristigen Druckversuches nachweisbar.

3. Vermehrung sowie Verminderung der Zellteilung unter dem Einfluß von 400 Atm. Druck sind deutlich p_H -abhängig. Sowohl im sauren als auch im alkalischen Bereich tritt bei 400 Atm. nicht jene Vermehrungsförderung ein, die in neutraler Lösung zu beobachten ist.

4. *Hydrodictyon reticulatum* (L.) reagiert auf den hydrostatischen Druck empfindlicher als *Chlorella*. Eine 26stündige Druckeinwirkung von 400 Atm. setzt das Zellwachstum bis zur Hälfte herab. Dagegen ist die stimulierende Wirkung des Druckes hier wesentlich geringer als bei *Chlorella*: nach einer Einwirkungsdauer von 200 Atm. während 5 Std. ist nur eine leichte Wachstumsförderung nachzuweisen.

5. 5stündige Druckeinwirkungen, in der Hell- und Dunkelphase angewendet, führten zu keinen völlig eindeutigen Ergebnissen über eine verschiedene Sensibilität gegenüber dem hydrostatischen Druck in der Tagesperiode.

6. Tiefe Temperaturen verstärken den Effekt des hydrostatischen Druckes. Eine 5stündige Druckeinwirkung von 200 Atm. bei 0° C verursacht eine eindeutige Verzögerung des Wachstums.

7. Geringe Überdrucke (1—2 atu.), welche nach FERLING stärkste Wirkungen auf das meristematische Wachstum höherer Wasserpflanzen ausüben, bleiben bei Algen (*Chlorella* und *Hydrodictyon*) ohne nachweisbaren Einfluß.

8. Morphologische Veränderungen an Desmidiaceen bei 5- und 26stündiger Einwirkung von 400 Atm. waren nicht feststellbar.

9. Eine nicht näher bestimmbare Cryptomonade zeigte bei Drücken von 300—500 Atm. in 5stündiger Einwirkungsdauer eine rapid gesteigerte Vermehrungsrate.

Literatur

BASSET, J., et M. A. MACHEBOEUF: Étude sur les effets biologiques des ultra-pressions: Résistance des bactéries, des diastases et des toxines aux pressions très élevées. C. r. Acad. Sci. (Paris) **195**, 1431 (1932). — Die Wirkung sehr hoher Drucke auf Enzyme. Ergebnisse der Enzymchemie **3**, 303 (1934). — CATTELL, MC K.: The physiological effects of pressure. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. **11**, 441—476 (1936). — CHLOPIN, G. W., u. G. TAMMANN: Über den Einfluß hoher Drucke auf Mikroorganismen. Z. Hyg. **45**, 171 (1903). — FERLING, E.: Die Wirkungen des erhöhten hydrostatischen Druckes auf Wachstum und Differenzierung submerser Blütenpflanzen. Planta (Berl.) **49**, 235—270 (1957). — GESSNER, F.: Hydrobotanik

Bd. I. Berlin: Deutscher Verlag der Wissenschaften 1955. — HITE, B. H., N. J. GIDDINGS and C. E. WEAKLY: The effect of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. *Bull. W. Va. agric. Exp. Sta.* No. 146 (1914). — JOHNSON, F. H., and C. E. ZO-BELL: The acceleration of spore disinfection by urethan and its retardation by hydrostatic pressure. *J. Bacter.* **57**, 359—362 (1949). — The retardation of thermal disinfection of *Bacillus subtilis* spores by hydrostatic pressure. *J. Bacter.* **57**, 353—358 (1949). — KANDLER, O.: Über die Beziehung zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese. *Z. Naturforsch.* **5b**, 423—437 (1950). — LARSON, W. P., T. B. HARTZELL and H. S. DIEHL: The effect of high pressures on bacteria. *J. Inf. Dis.* **22**, 271 (1918). — NEEB, O.: Hydrodictyon als Objekt einer vergleichenden Untersuchung physiologischer Größen. *Flora (Jena)* **139**, 39 (1952). — OPPENHEIMER, C. H., C. E. ZO-BELL and F. H. JOHNSON: The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J. Marine Res.* **11**, 10—18 (1952). — PATAU, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen. (Eine neue *t*-Tafel.) *Biol. Zbl.* **63**, 152—168 (1943). — ZO-BELL, C. E.: Bacterial life at the bottom of the Philippine trench. *Science (Lancaster, Pa.)* **115**, 507—508 (1952). — Hydrostatic pressure as a factor affecting the viability and activities of bacteria in the sea. *Atti 6. Congr. internat. Microbiol.* **7**, 372—373 (1955). — ZO-BELL, C. E., and F. H. JOHNSON: The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestrial and marine bacteria. *J. Bacter.* **57**, 179 (1949). — ZO-BELL, C. E., and C. H. OPPENHEIMER: Some effects of hydrostatic pressure on the multiplication and morphology of marine bacteria. *J. Bacter.* **60**, 771—784 (1950).

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie der Universität Turin)
Vorstand: G. F. DE GAETANI

Das Bakterien/L-Formen-Verhältnis in den aus Mäusen isolierten Proteus- und Salmonella-Stämmen

Von
TULLIO TERRANOVA u. PAOLO DE GREGORIO

(Eingegangen am 17. Mai 1957)

Viele Bakterienstämme erzeugen, wenn sie längere Zeit im Laboratorium gezüchtet werden, keine L-Formen; wenn dagegen ihre Isolierung erst vor kurzem erfolgte, zeigen sie einen natürlichen Pleomorphismus und werden leichter in L-Formen umgewandelt (DIENES 1950, TULASNE 1951).

Bei früheren Untersuchungen hatten wir nachweisen können, wie wichtig die Überimpfung auf Tiere ist, um L-Formen zu erhalten (DE GREGORIO u. TERRANOVA). Es wurde beobachtet, daß die Umwandlung bei 60% der aus Mäusen isolierten *Salmonella*-Stämme und bei 20% der Laboratoriums-Stämme zu erreichen ist. Diese Befunde wurden auf die im tierischen Organismus stattgefundenen Bakterienveränderungen zurückgeführt. Wir stellten weiterhin fest, daß bei einem bestimmten Bakterienstamm und unter besonderen Untersuchungsbedingungen immer eine gleiche Zahl von Bakterien im Stande ist, L-Formen zu erzeugen, so daß das Bakterien : L-Kolonien-Verhältnis (B/L-Verhältnis) unverändert bleibt (TERRANOVA u. DE GREGORIO).

Es wurden nun Untersuchungen angestellt, um bei Laboratoriums-Stämmen und den aus der Maus isolierten Bakterienstämmen das B/L-Verhältnis zu bestimmen, die aus Laboratoriums-Stämmen erzeugten L-Formen quantitativ auszuwerten und die nach Überimpfung in einem tierischen Organismus vorkommenden Veränderungen zu verfolgen.

Material und Methode

Bakterienstämme. *Proteus* *P*₁₈ und *Ahmed*, *Salmonella* 240 und 168 aus dem Laboratorium von Prof. TULASNE; *Salmonella* *Heittingfoos* 95 und *Schottmülleri* 679, die erste aus dem Internationalen Zentrum für Salmonellen unter der Leitung von Prof. KAUFFMANN, die zweite aus dem „Istituto Sieroterapico Italiano“.

Kulturflüssigkeiten. „Difco Heart Infusion Agar“, mit dem Zusatz von 20 v.G. Pferdeserum und 5000 E/ml von Natrium G-Penicillin (Leo); „Difco Brain Heart Infusion“.

Bakterienimpfung und -isolierung. In das Peritoneum der Maus werden 0,5 ml einer Bakterienaufschwemmung stets gleicher Trübung (350 am

Klett und Summerson Photocolorimeter mit Filter 42) aus einer 24 Std-Kultur auf Agar geimpft. Nach 8 Std werden die Bakterien aus dem Peritoneum isoliert und in 5 ml Bouillon geimpft.

Bakterienimpfung und Erzeugung von L-Kolonien. Diese wird mit der in einer früheren Arbeit beschriebenen Agar-Gußtechnik (TERRANOVA u. DE GREGORIO) durchgeführt.

Tabelle 1. *L-Kolonien-Erzeugung aus Laboratoriums- und aus Mäusen isolierten Proteus- und Salmonella-Stämmen*

L = Laboratoriumsstämme — M = aus Mäusen isolierte Stämme — B = normale Kolonien — L = L-Kolonien. Mittlere Werte von 10 Untersuchungen

Bakterienstämme		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	B/L-Verhältnis
<i>P₁₈</i>	L B						1802	184	19	1	0	
	L L					732	70	7	0			26
	M B						4980	500	51	5	0	
	M L					3420	346	35	3	0		14
<i>Ahmed</i>	L B						1240	120	11	1	0	
	L L				520	51	5	0				250
	M B						950	94	9	0		
	M L			4900	494	50	5	0				180
<i>S. 240</i>	L B					4900	481	48	4	0		833 000
	L L	58	5	0								
	M B						370	36	3	0		450 000
	M L	80	8	0								
<i>S. 679</i>	L B					4300	420	42	4	0		10 700 000
	L L	4	0									
	M B						805	80	8	0		7 300 000
	M L	11	1	0								
<i>S. 168</i>	L B						2000	200	21	2	0	20 000 000
	L L	10	1	0								
	M B						540	55	5	0		13 700 000
	M L	4	0									
<i>S. 95</i>	L B						1021	100	9	0	0	5 000 000
	L L	20	2	0								
	M B						894	90	9	0		3 000 000
	M L	29	3	0								

Ergebnisse

Die in Tab. 1 dargestellten Befunde zeigen, daß das Bakterienkolonien/L-Kolonien-Verhältnis je nach der Art und dem Bakterienstamme verschieden ist. Das niedrigste B/L-Verhältnis (26) wird bei *Proteus P₁₈* beobachtet; auch *Proteus Ahmed* hat ein sehr niedriges Verhältnis (250). Dagegen finden wir bei *Salmonella* hohe Werte: von 833 000 bei Stamm *S. 240* bis zu 20 Millionen bei Stamm *S. 168*. Während sich bei beiden *Proteus*-stämmen (*Proteus P₁₈* und *Proteus Ahmed*) eine L-Kolonie je 26 bzw. 250 Normalkolonien bildet, wird bei *Salmonella*

(*S. 240* und *S. 168*) eine L-Kolonie je 833 000 bzw. je 20 Millionen normaler Kolonien erzeugt.

Aus diesen Befunden geht auch hervor, daß das B/L-Verhältnis bei den aus der Maus isolierten Stämmen niedriger ist. Es ist 14 bzw. 180 für beide *Proteus*-Stämme, 450 000 für *S. 240* und 13 Millionen für *S. 168*. Es wird damit gezeigt, daß Bakterienstämme nach Aufenthalt im tierischen Organismus eine höhere L-Kolonienzahl erzeugen als die entsprechenden Laboratoriums-Stämme.

Diskussion

Die Bildung von L-Formen bei Bakterien wurde der Anwesenheit bestimmter Zellen in Bakterienstämmen zugeschrieben, welche die Art mittels einer besonderen Vermehrung — L-Cyclus — erhalten sollten. Dieser Cyclus wird in Gang gesetzt, wenn die Bakterien sich unter Bedingungen befinden, die ihr normales Wachstum stören (TULASNE 1951). CARRERE u. ROUX (1955) nehmen an, daß eine Bakterienkultur aus Zellen verschiedener Leistungsfähigkeit besteht, unter denen einige infolge ihrer Anpassungsfähigkeit durch das schädigende Agens sozusagen ausgewählt werden. Letztere gewährleisten das Überleben der Art mittels der L-Formen-Erzeugung (CARRERE u. ROUX 1955).

Unsere Untersuchungen zeigen, daß bei den Bakterienstämmen, die die Fähigkeit haben, die L-Formen zu erzeugen, immer eine gleiche Zahl von Bakterien vorhanden ist, die die L-Umwandlung aufweisen können, so daß das normale Kolonien/L-Kolonien-Verhältnis immer ein gleiches ist. Die Bedeutung und Unveränderlichkeit dieses Verhältnisses hängt von der Bakterienart und den Untersuchungsbedingungen ab. Die Veränderlichkeit des B/L-Verhältnisses je nach der Art, z. B. daß sich bei *Proteus* *P*₁₈ eine L-Kolonie je 16 normale Kolonien bildet, während bei *Salmonella* 168 das Verhältnis 1:20 Millionen vorliegt, weist auf einen wesentlichen biologischen Unterschied zwischen beiden Arten hin. Die in der L-Formen-Erzeugung beobachteten Unterschiede können mit dem Umstand in Zusammenhang gebracht werden, daß bei *Proteus* viele oder fast alle Zellen eine L-Umwandlung aufzuweisen imstande sind; dagegen ist die Zahl der zu dieser Umwandlung fähigen Zellen bei *Salmonella* sehr gering.

Die bei aus Mäusen isolierten Stämmen beobachtete Steigerung der L-Kolonien-Erzeugung weist auf eine prozentuale Zunahme der Zellenzahl hin, die zu einer Umwandlung in L-Formen fähig sind. Dies kann mit dem Umstand in Zusammenhang gebracht werden, daß im tierischen Organismus die widerstandsfähigsten Zellen der Bakterienstämme ausgewählt werden und dies die Zellen sind, welche das Überleben der Art durch die L-Umwandlung gewährleisten.

Schlußfolgerungen und Zusammenfassung

Aus dem bei einigen Bakterienstämmen durchgeführten Studium des Bakterien/L-Formen-Verhältnisses (B/L-Verhältnis) ging hervor, daß bei einer Bakterienart immer eine gleiche Zahl von Zellen vorhanden ist, die L-Umwandlungen aufweisen. Diese Zahl ist je nach der Art verschieden. Bei zwei *Proteus*-Stämmen und vier *Salmonella*-Stämmen und den gleichen aus der Maus isolierten Stämmen war das Bakterienkolonien/L-Kolonien-Verhältnis für beide *Proteus*-Stämme sehr niedrig, und zwar für P_{18} : 16, für *Ahmed*: 250; dagegen zeigen Salmonellen ein hohes Verhältnis (*S. 240*: 850000; *S. 168*: 20 Millionen).

Außerdem wurde beobachtet, daß die gleichen Bakterienstämme nach Aufenthalt in der Maus eine höhere Zahl von L-Kolonien erzeugen. Es wird angenommen, daß im tierischen Organismus die widerstandsfähigsten Zellen der Bakterienstämme ausgewählt werden und daß diese Zellen auch die Fähigkeit haben, das Überleben der Art durch den L-Cyclus zu sichern.

Literatur

CARRERE, L., et J. ROUX: Montp. Méd. 47, 405 (1955). — DIENES, L., H. J. WEINBERGER and S. MADOFF: J. Bacter. 59, 755 (1950). — DE GREGORIO, P., e T. TERRANOVA: (im Druck). — TERRANOVA, T., e P. DE GREGORIO: (im Druck). — TULASNE, R.: Rev. Immunol. 15, 233 (1951). — Symposium Cytologia Bacterica, VI Congr. Internaz. Microbiol., Roma, 1953.

(Medizinische Akademie Sofia, Institut für Mikrobiologie und Institut für Biochemie)

Veränderungen des elektrokinetischen Potentials bei penicillinresistenten und penicillinempfindlichen Staphylokokken nach der Bearbeitung mit Fermenten

Von

K. IW. MARKOV und G. K. SAEV

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Juli 1957)

Zahlreiche Untersuchungen über die Oberflächenstruktur der Staphylokokken mit Hilfe von Oberflächenaktivstoffen (DYAR u. ORDAL 1946, DYAR 1948, MCQUILLEN 1950) oder Fermenten (HARRIS 1953) haben ergeben, daß in dieser Grenzschicht Nucleinsäuren, Lipotide und Eiweiße vorhanden sind. Von diesen Bestandteilen der Zelloberfläche hängt die Gramfärbung (HENRY u. STACEY 1946) und das Penicillinbindungsvermögen der Staphylokokken ab (FEW, COOPER u. ROWLEY 1952).

Bei früheren Untersuchungen über die Veränderungen des EKP bei der Adaptation der Staphylokokken an das Penicillin haben wir festgestellt, daß mit der Steigerung der Penicillinresistenz der IEP der Staphylokokken sich nach schwächer saurer Richtung hin verschiebt (MARKOV u. SAEV 1956). Diese Verschiebung der IEP gab uns genügend Anlaß, anzunehmen, daß auf der Staphylokokkenoberfläche eine Abnahme der Phosphorsäuregruppen zustandekommt. In der vorliegenden Arbeit stellten wir uns die Aufgabe, die Oberflächenstruktur der penicillinempfindlichen und penicillinresistenten Staphylokokken durch Bearbeitung mit Fermenten weiter zu untersuchen.

Methodik

Staphylokokkenstämme. Die Versuche wurden mit je 5 penicillinempfindlichen und penicillinresistenten, aus pathologischen Prozessen isolierten Stämmen durchgeführt. Die empfindlichen Stämme 73, 190, 202, 635, 4553 werden vom Penicillin in Grenzen zwischen 0,0015 und 0,2 E/ml gehemmt. Die resistenten Stämme 98, 319, 671, 1555, 3578 zeigen eine Resistenz zwischen 300 und 8000 E/ml. Dazu kommen noch die „in vitro“ an das Penicillin adaptierten Stämme 209 P (Resistenz 5000 E/ml; Anfangsresistenz 0,03 E/ml) und 190 P (Resistenz 4000 E/ml; Anfangsresistenz 0,0015 E/ml).

Fermente: Alkalische Darmphosphomonoesterase — höchst gereinigtes Präparat aus der Darmschleimhaut von Kälbern nach MORTON (1954) hergestellt¹.

¹ Gearbeitet wurde auch mit der uns von Dr. R. K. MORTON-Melbourn freundlichst zur Verfügung gestellten Phosphomonoesterase. Hier sprechen wir Dr. MORTON unseren besten Dank dafür aus.

Ribonuclease in Kristallform. Herstellung „Chemilaborchemikalien“ Berlin. Das Präparat nach der Methode von KEITH, KAZENKO u. LASKOWSKI (1947) untersucht, erwies sich als frei von proteolytischen Enzymen (HADJIOLOV u. ZACHARIEVA 1957).

Trypsin. Herstellung British Drughaus.

Bearbeitung der Staphylokokken mit Fermenten. Die in 0,067 m Phosphat-Puffer (p_H 8,0) gelösten Fermente wirken 4—8 Std lang bei 37° C. Die Endkonzentrationen der Fermentlösungen: Phosphomonoesterase und Ribonuclease — 0,1 mg/ml, Trypsin — 10 mg/ml. Eine 24stündige Agarkultur des untersuchten Stammes wird mit dest. Wasser aufgeschwemmt und die erhaltene Suspension mittels Zentrifugieren ausgewaschen. Nach der Bearbeitung mit dem Ferment und nach wiederholtem Auswaschen wird eine Suspension zubereitet, die eine Konzentration von 10^9 Zellen/ml hat und von der je 0,05 ml zu 2,5 ml zehnfach verdünntem Puffer von CLARK u. LUBS mit p_H von 1,0—5,0 gegeben wird.

Nach der Bearbeitung der Staphylokokken mit Fermenten bleiben die Keime lebensfähig, ohne dabei irgendwelche morphologische oder biochemische Veränderungen aufzuweisen.

Messung des EKP. Es wird die in früheren Arbeiten beschriebene mikroelektrophoretische Methode zur Bestimmung des EKP verwendet (MARKOV, SAEV 1954). Der höchstmögliche Fehler jedes auf den Diagrammen eingetragenen Wertes übersteigt nicht 5 %.

Untersuchungsergebnisse

Veränderungen des EKP und IEP nach der Bearbeitung mit alkalischer Darmphosphomonoesterase. Es wird eine leichte Herabsetzung des EKP bei den niedrigeren p_H -Werten beobachtet, sowie eine Tendenz zur Verschiebung des IEP in schwächer saurer Richtung (Abb. 1). Das gilt für die penicillinresistenten sowie für die penicillinempfindlichen Staphylokokken. Die abgelesenen Veränderungen übersteigen jedoch nicht die Grenze des möglichen Fehlers.

Veränderungen des EKP und IEP nach der Bearbeitung mit Ribonuclease. Es findet eine deutliche Verschiebung des IEP der empfindlichen sowie resistenten Staphylokokken in p_H -Grenzen zwischen 2,0—3,0 statt. Hervorgehoben sei, daß diese Verschiebung des IEP bei den penicillinempfindlichen Staphylokokken weit stärker ausgeprägt ist. Bei den resistenten Keimen liegt der IEP auch vor der Bearbeitung mit Ribonuclease diesem p_H -Wert sehr nahe (p_H 2,0), während er bei den empfindlichen Staphylokokken weit entfernt ist (p_H 1,0). Das ist aus Abb. 2 ersichtlich. Hier sind die Untersuchungsergebnisse für je 3 empfindliche und je 3 resistente Staphylokokken-Stämme angegeben. Bei den Stämmen *Staph. aureus* 209 und *Staph. aureus* 209 P (Abb. 1) verlaufen die EKP-Kurven in gleicher Weise.

Veränderungen des EKP und IEP nach der Bearbeitung mit Trypsin. Es wird ein allgemeines Erhöhen des absoluten EKP-Wertes, besonders um p_H 3,0 festgestellt. Der IEP bleibt unverändert (Abb. 1).

Besprechung der Ergebnisse

Der EKP ist einer der zugänglichen Indexe zur Erforschung der Bakterienoberfläche. Wenn die Bakterienoberfläche als ampholyt betrachtet wird, drückt der IEP die Verhältnisse zwischen Säure- und Basengruppen auf der Oberfläche aus. Abgesehen davon, daß zwischen den Dissoziationskonstanten und IEP ein genaues Wechselverhältnis

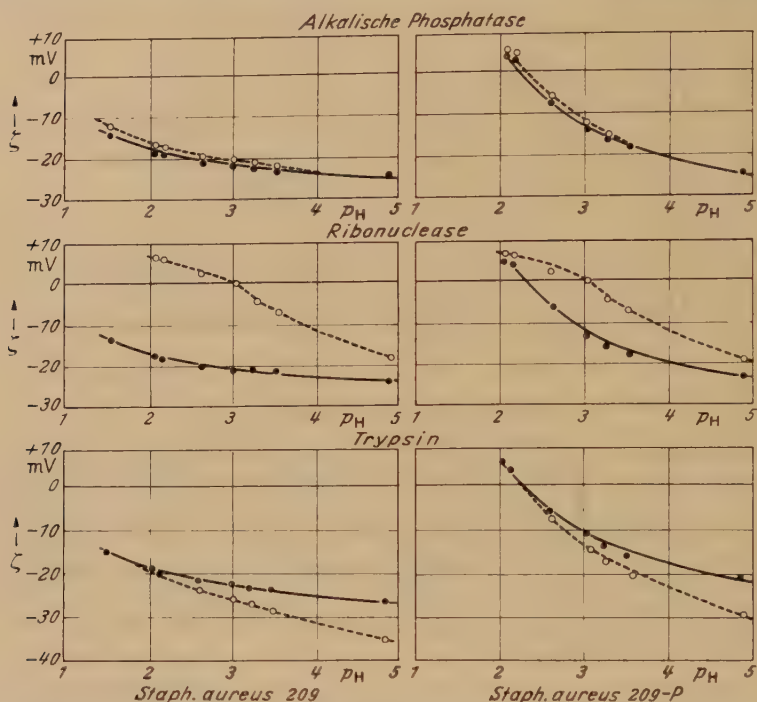


Abb. 1. EKP des penicillinempfindlichen Stammes 209 und der penicillinresistenten Variante 209 P
 — EKP vor der Bearbeitung mit Fermenten; ---- EKP nach der Bearbeitung mit Fermenten

besteht (PASSYNSKI 1938), beschränken wir unsere Schlußfolgerungen in quantitativer Hinsicht auf die nach der Bearbeitung mit den Fermenten eintretenden Veränderungen. Die nach der Bearbeitung mit alkalischer, frei von Diesterasen, Darmphosphomonoesterase (MORTON 1955) erhaltenen Resultate zeigen, daß die penicillinresistenten sowie die penicillinempfindlichen Staphylokokken sehr wenig Monoester der Phosphorsäure auf ihrer Oberfläche enthalten.

Für das Vorhandensein von Ribonucleinsäure (RNS) sprechen die durch Ribonucleasewirkung erzielten Veränderungen. Nach der Bearbeitung mit Ribonuclease wird bei den penicillinempfindlichen und -resistenten Staphylokokken eine Grundsicht frei, die keine Ester der

Phosphorsäure enthält und nur durch Trypsin zu beeinflussen ist. Diese Ergebnisse geben uns Veranlassung, anzunehmen, daß in der äußersten Schicht der Staphylokokkenoberfläche höchst polymere Nucleinsäure vorhanden ist, die wenig Phosphomonoestergruppen enthält. Die Menge der RNS verringert sich beträchtlich bei der Adaptation der Staphylokokken an Penicillin.

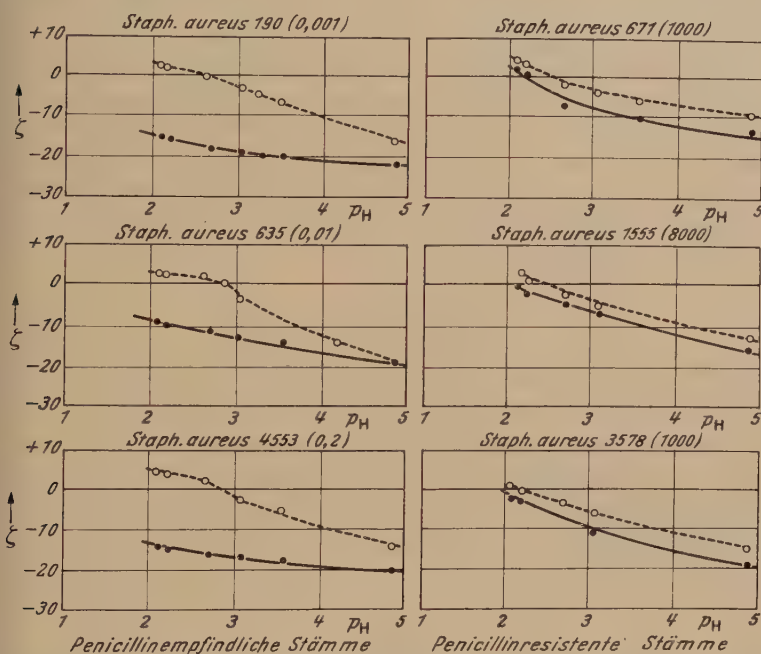


Abb. 2. EKP von 3 penicillinresistenten und 3 penicillinempfindlichen Stämmen. — EKP vor der Bearbeitung mit Ribonuclease; ---- EKP nach der Bearbeitung mit Ribonuclease. Die Zahl hinter jeder Nummer des *Staph. aureus*-Stammes bedeutet den Resistenzwert in E/ml

Auf Grund der IEP-Stellungen kann man schließen, daß die Menge der sich oberflächlich befindenden RNS der penicillinresistenten und -empfindlichen Staphylokokken im Verhältnis 1:10 steht. Die Versuche mit Trypsin zeigen, daß außer der RNS auf der Oberfläche der Staphylokokken auch Peptidverbindungen vorhanden sind. Dafür spricht die Zunahme des EKP nach der Trypsinbearbeitung, besonders in einem pH-Bereich, in dem eine Dissoziierung der Carboxylgruppen stattfindet. Die Trypsinwirkung bleibt bei den penicillinempfindlichen und -resistenten Staphylokokken gleich. Das Vorhandensein von RNS und Peptidverbindungen auf der Staphylokokkenoberfläche spricht nicht gegen das von HIRST (1952) festgestellte Vorhandensein von Lipoiden. Die Messung des EKP nach der Bearbeitung der Staphylokokken mit lipoidlösenden

Mitteln gibt uns jedoch keine Veranlassung, anzunehmen, daß die Oberflächenlipide stark saure Gruppen besitzen. Die nach der Bearbeitung mit Ribonuclease auftretenden Veränderungen entsprechen der von HARRIS (1953) beobachteten Herabsetzung des EKP um pH 3,0 nach Bearbeitung der Staphylokokken mit Ribonuclease.

BOLLE (1955) findet eine allgemeine Vermehrung der RNS bei den penicillinresistenten Staphylokokken im Vergleich mit den penicillinempfindlichen. Diese Tatsache widerspricht der von uns beobachteten Verarmung der Staphylokokkenoberfläche an RNS. Wir nehmen an, daß dieser Widerspruch damit zu erklären ist, daß die Entstehung der Penicillinresistenz von Veränderungen in der RNS-Verteilung in der Zelle begleitet ist. Es ist möglich, daß die RNS-Verminderung auf den gestörten Aminosäurenstoffwechsel zurückzuführen ist. Dafür spricht die Möglichkeit der penicillinresistenten Staphylokokken, Aminosäuren zu synthetisieren (GALE u. RODWELL 1949).

Schlußfolgerungen

1. Bei den penicillinresistenten Staphylokokken wird eine Verminderung der oberflächlich verteilten Ribonucleinsäure festgestellt.

2. Im Gehalt der von Trypsin angreifbaren Peptidverbindungen besteht bei den penicillinempfindlichen und penicillinresistenten Staphylokokken kein Unterschied.

3. Die Staphylokokkenoberfläche ist arm an Monoester der Phosphorsäure.

Literatur

- BOLLE, A.: Comparaison biochimique d'une souche sensible avec une souche resistente aux antibiotiques. Ann. inst. Pasteur **88**, 258—260 (1955). — DYAR, M. T.: Elektrokinetic studies on bacterial surfaces. II. Studies on surface lipides amphoteric material and some other surface properties. J. Bacter. **56**, 821—834 (1948). — DYAR, M. T., and E. J. ORDAL: Elektrokinetic studies on bacterial surfaces. I. The effects of surface active agents on the electrophoretic mobilities of bacteria. J. Bacter. **51**, 149—157 (1946). — FEW, A. V., F. D. COOPER and D. ROWLEY: Reaction of penicillin with the staphylococcal cell wall. Nature (Lond.) **169**, 283—284 (1952). — GALE, E. F., and A. W. RODWELL: Assimilation of amino acids by bacteria. VII. The nature of resistance to penicillin in staphylococcus aureus. J. Gen. Microbiol. **3**, 127—142 (1949). — HADJIOLOV, A. A., u. L. ZACHARIEVA: Der Einfluß der kristallinen Ribonuklease auf das Wachstum des Karzinoms von Guérin. Naturwissenschaften **44**, 45 (1957). — HARRIS, I. O.: Electrophoretic behavior and crystal violet adsorption capacity of ribonuclease-treated bacterial cell. J. of Exper. Biol. **29**, 30—53 (1952). — HENRY, H., and M. STACEY: Histochemistry of the Gram-staining reaction for microorganism. Proc. Roy. Soc. (Lond.) **133 B**, 391 (1946). — HURST, H.: Electron-diffraction study of the structure and orientation of the lipids in yeast and bacterial cell walls. J. of Exper. Biol. **29**, 30—53 (1952). — KEITH, C. K., A. KAZENKO and A. LASKOWSKI: Studies on proteolytic activity of crystalline

protein B prepared from beef pancreas. J. of Biol. Chem. **170**, 227—238 (1947). — MARKOV, K. I., u. G. K. SAEV: Elektrophoretische Untersuchungen an Bakterien. I. Mikroskopische Methode zur Bestimmung des elektrokinetischen Potentials der Bakterien (bulg.). Sovr. Med. **5**, Nr. 4, 59—68 (1954). — Veränderungen des elektrokinetischen Potentials bei der Adaptation der Staphylokokken an Penicillin. Arch. Mikrobiol. **25**, 201—207 (1956). — MORTON, R. K.: The purification of alkaline phosphatases of animal tissues. Biochemic. J. **57**, 595—603 (1954). — The substrate specificity and inhibition of alkaline phosphatases of cow's milk and calf intestinal mucosa. Biochemic. J. **61**, 232—240 (1955). — PASSYNSKI, A.: Ein Beitrag zur Theorie des isoelektrischen Punktes von Proteinen (russ.). Acta physikochem. URSS **8**, 357—370 (1938). — MCQUILLEN, K.: Bacterial surface. I. Effect of cetyltrimethylammoniumbromide on the electrophoretic mobility of certain Gram positive bacteria. Biochim. et Biophysics. Acta **5**, 463—471 (1950).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

Über die Carotinoide von *Chlorobium chlorochromatii* n. sp.

Von

HELGA WITTMANN

(Eingegangen am 1. August 1957)

MECHSNER (1957) stellte in der von ihm aus *Chlorochromatium aggregatum* (= *Chloronium mirabile*) isolierten grünen Komponente, die er *Chlorobium chlorochromatii* n. sp. nannte, fest, daß größere Mengen Carotinoide enthalten waren im Gegensatz zu *Chlorobium limicola* und *Chlorobium thiosulfatophilum*, in denen er nur sehr geringe Mengen fand. Zweck der vorliegenden Untersuchung sollte sein, diese Carotinoide zu charakterisieren.

GOODWIN u. LAND (1956) konnten aus dem Farbstoffextrakt von *Chl. limicola*, *Chl. thiosulfatophilum* und einer halophilen Art als Hauptcarotinoide γ -Carotin (10—15% des Gesamtfarbstoffes) und Rubixanthin (85% des Gesamtfarbstoffes) isolieren, in geringen Mengen noch pro- γ -Carotin; daneben fanden sie 3 nicht identifizierte Carotinoide, die auch Kunstprodukte darstellen können.

Methodik. Nach der von MECHSNER beschriebenen Methode wurden die Organismen in 5000 cm³ Stöpselflaschen anaerob auf der von ihm angegebenen Nährlösung D für Chlorobakterien bei 28° C und Belichtung gezogen. Die Extraktion und Verseifung der Pigmente erfolgte nach den Angaben von GOODWIN u. LAND (1956) sowie GOODWIN u. MORTON (1946).

Zur säulenchromatographischen Trennung der Carotinoidlösung in Petroläther (KP 40° C) wurde Aluminiumoxyd (sauer, Aktivitätsstufe 1, Woelm) verwendet. Entwickelt wurde mit Benzin (KP 60—80° C) mit geringem Methanolzusatz. Es trennten sich 2 Zonen, oben eine breite orange gefärbte Zone A, darunter eine schmale gelbe Zone B. Die Elution erfolgte mit Methanol, die spektralphotometrische und spektroskopische Prüfung in Chloroform, Petroläther und Hexan.

Zur papierchromatographischen Trennung des Carotinoidgemisches wurde die von WITTMANN (1957) angegebene Methode angewandt. Die Farbstofflösung trennte sich auch hierbei entsprechend dem Säulenchromatogramm in 2 Zonen. Die äußere Zone war gelb-orange gefärbt, die innere orange-rot.

Tab. 1. Absorptionsmaxima der gefundenen Carotinoide

	Lösung A			Lösung B		
in Chloroform.	509	474	439 m μ	509	475	446 m μ
in Petroläther	495	463	432 m μ	495	461	431 m μ
in Hexan.	494	462	431 m μ	494	462	431 m μ

Ergebnis: Im Beckman-Spektralphotometer konnten die in Tab. 1 angegebenen Maxima gemessen werden. Die im Zeiss-Handspektroskop beobachteten Absorptionsbanden entsprachen den in Tab. 1 angegebenen Werten.

Bei der Verteilungsprobe zwischen Petroläther und 95% igem Methanol verhielt sich der Farbstoff der Lösung A hypophasisch, der der Lösung B epiphasisch.

Die Werte der Absorptionsmaxima und -banden der Lösung A entsprechen denen für Rubixanthin (3-hydroxy- γ -Carotin), die Werte der Lösung B den in der Literatur angegebenen Werten für γ -Carotin.

Auf Grund der Absorptionsmaxima und -banden, sowie des chromatographischen Verhaltens und des Verhaltens bei der Verteilungsprobe lassen sich bei der von MECHSNER aus dem Konsortium *Chlorochromatium aggregatum* isolierten grünen Komponente *Chlorobium chlorochromatii* n. sp. 2 Carotinoide bestimmen, das Rubixanthin und γ -Carotin, wobei das Rubixanthin überwiegt (geschätzt nach dem Papierchromatogramm).

Es werden demnach die gleichen Hauptcarotinoide gebildet wie von *Chl. limicola* und *Chl. thiosulfatophilum* und in etwa gleichem Verhältnis. Damit zeigt die von MECHSNER isolierte grüne Komponente nicht nur gleiche morphologische Eigenschaften wie *Chlorobium*, sondern auch eine Übereinstimmung im Vorkommen und in der Verteilung ihrer Carotinoide.

Zusammenfassung

Chlorobium chlorochromatii n. sp. enthält γ -Carotin und Rubixanthin (dieses überwiegend) und gleicht somit in dieser Hinsicht den übrigen *Chlorobium*-Arten.

Literatur

GOODWIN, T. W., and D. G. LAND: Biochem. J. **62**, 553 (1956). — GOODWIN, T. W., and R. A. MORTON: Analyst **71**, 15 (1946). — MECHSNER, K.: Arch. Mikrobiol. **26**, 32 (1957). — WITTMANN, H.: Arch. Mikrobiol. **25**, 373 (1957).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

Über die Wirkung von Kobalt-Ionen auf das Cytochromsystem und die Katalase-Aktivität von *Proteus vulgaris* Hauser

Von
E. PETRAS

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. August 1957)

Bei Untersuchungen über Probleme des durch chemische Reize ausgelösten Bakterienheteromorphismus (PETRAS 1957) ergab sich die Frage nach dem Mechanismus der bakteriostatischen Wirkung von Kobalt-Ionen.

TALTS (1932) war der Ansicht, der Hemmeffekt dieses Schwermetalls beruhe auf einer Verdichtung der äußeren Plasmaschicht, die ihrerseits die Nahrungsaufnahme erschwere. Daß Bakterien (wie auch andere Mikroorganismen) tatsächlich Kobalt in starkem Maße anzureichern vermögen, fanden z. B. NEYLAND, DUNKEL u. SCHADE (1952) bei *Proteus vulgaris* (maximal 8,64% des Trockengewichts an Co^{++} -Ionen). Dem entspricht auch die von SCHADE (1949) beobachtete starke Abhängigkeit der Kobalt-Ionenwirkung von der Bakterien-Konzentration.

Wie aus den Ergebnissen verschiedener Untersuchungen hervorgeht, ist die von TALTS aufgestellte Theorie jedoch zu einseitig. So wurde beobachtet, daß bei *Proteus vulgaris* eine deutliche Beziehung zwischen Kobalt-Hemmeffekt und Belüftungsverhältnissen besteht (SCHADE 1949; PETRAS 1957) und daß die aerobe Atmung von *Bacillus asterosporus* durch Kobalt-Ionen zugunsten einer hemolaktischen Gärung unterdrückt wird (DEDIC u. KOCH 1955). Hieraus läßt sich vielmehr auf eine mehr oder weniger direkte Beeinflussung des Atmungssystems schließen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Versuch zur Klärung der Verhältnisse unternommen.

Methodik

Als Testorganismus diente *Proteus vulgaris* Hauser, Stamm 556 des Göttinger Hygiene-Institutes. Das verwendete Standardmedium hatte (in Anlehnung an BELOSERSKI 1939) folgende Zusammensetzung: $\text{Na}(\text{NH}_4)\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g; KH_2PO_4 0,5 g; K_2HPO_4 0,5 g; MgSO_4 0,4 g; NaCl 0,1 g; Asparagin 5,0 g; Glucose 10,0 g; Nicotinsäureamid Spur; Hoaglandsche Spurenelementlösung 1 ml; Aqua dest. ad 1 l; eventuell Agar 20 g; Bebrütungstemperatur 26°C ; pH 7,2.

Kultiviert wurde in 4 l-Penicillinkolben, die entweder 250 ml festes oder (senkrecht gestellt) 2 l flüssiges Substrat enthielten. Beimpft wurde jeweils mit 10 ml einer 24 Std alten Bouillon-Kultur.

Die Bakterienzahl wurde mit Hilfe einer Thoma-Zeiß-Zählkammer bestimmt.

Nicotinsäureamid wurde papierchromatographisch nachgewiesen. Dabei fanden folgende Lösungsmittelsysteme Verwendung: I: n-Butanol 30:Ammoniak (d = 0,88) 1:Wasser 20; II: n-Butanol 45:Aceton 5:Wasser 50; III: n-Butanol 30:Eisessig 1:Wasser 20. Die getrockneten Chromatogramme wurden mit 4% iger alkoholischer Lösung von 2,4-Dinitrochlorbenzol besprüht, 45 min bei 85–90° C im Trockenschrank aufgehängt und darauf mit 4% iger wäßrig-alkoholischer (1:1) NaOH behandelt¹.

Bei Isotopen-Versuchen wurden die Angaben von GÖTTE (1955) zugrunde gelegt. Zwei Liter Standardnährlösung mit Zusatz von CoCl_2 in $2 \cdot 10^{-3}$ m Konzentration und 200 $\mu\text{C } ^{60}\text{Co}$ wurden an 3 aufeinanderfolgenden Tagen mit der Bakterienausbeute von je 1 Liter 2 Tage alter Normalkultur beimpft. 5 Tage nach der ersten Beimpfung wurden die Bakterien geerntet. Die klare Nährlösung wurde papierchromatographisch und autoradiographisch auf mögliche Kobalt-Nicotinsäureamid-Komplexe untersucht. Ein Teil der aus der Nährlösung gewonnenen Bakterien sowie die Ernte einer entsprechenden Agarkultur (1 l Standard-Agar, $2 \cdot 10^{-3}$ m CoCl_2 , 200 $\mu\text{C } ^{60}\text{Co}$, Ernte 4 Tage nach Beimpfung) wurden papierelektrophoretisch und autoradiographisch untersucht.

Zur Papierelektrophorese wurden die Bakterienzellen entweder in einem „Mickle tissue integrator“ mit Glasperlen zertrümmert oder nach BERTI u. CIMA (1956) 36 Std bei 37° C ($\text{pH } 7,5$) mit 3 m Glykokoll lysiert. Anschließend wurde die Suspension auf Filterpapierstreifen (Schl. u. Sch. 2043 b, 4 · 28 cm) aufgetragen; die Apparatur entsprach im wesentlichen den Angaben von GRASSMANN, HANNIG u. KNEDEL (1951, 1952). Entsprechend den Angaben von TIDDENS (1957) wurde Glykokoll-Puffer ($\text{pH } 9,6$) verwendet. Die Stromstärke betrug je Streifen etwa 1,4 Milliamp., die Spannung etwa 110 V, die Laufzeit bis zu 6 Tagen. Als Färbemittel diente Azocarmin B (Methode von KÖRVER 1950, 1953).

Zur Cytochrom-Bestimmung wurden Bakterien geerntet, mit m/15 Phosphat-Puffer gewaschen und nach Reduktion mit Na-dithionit in dicker Suspension spektroskopisch untersucht (vergl. FUJITA u. KODAMA 1934). Bei der Präparation des Materials wurde streng darauf geachtet, daß keine Luftbläschen in die Suspension gelangten. Die Katalase-Bestimmung erfolgte nach den Angaben von SUMNER u. SOMERS (1953).

Zur Porphyrin-Bestimmung wurde die Methode von PAPPENHEIMER (1947) angewendet.

Ergebnisse

Den Einfluß der Kobalt-Ionen auf die Keimzahl bei flüssigem Substrat zeigt Abb. 1. Bei der in den weiteren Versuchen — wenn nicht anders angegeben — verwendeten $2 \cdot 10^{-3}$ m Konzentration bedingen diese eine Verlängerung der Lag-Phase und reduzieren die maximale Zellzahl auf etwa $\frac{1}{3}$ des Kontrollwertes. Durch geringe Erhöhung der Kobalt-Konzentration wird die Zellteilung vollständig unterdrückt; eine eindeutige Absterbekurve wurde nie beobachtet, dagegen ein allmähliches Kleinerwerden der Zellen bis zur Bildung von kleinen Kurzstäbchen und

¹ Alle Daten vgl. VOGEL, 2. Band, II. Teil, S. 113–115 (1955).

kokkoiden Formen. Bei Agar-Kultur ließ sich Bakterienwachstum nur mit $1 \cdot 10^{-3}$ m Kobalt-Gehalt erzielen, höhere Konzentrationen hatten rasche Autolyse zur Folge.

In orientierenden Vorversuchen wurde nun zunächst die Ansicht von SCHADE (1949) weitgehend bestätigt, wonach Nicotinsäureamid-Mangel durch den Kobalt-Zusatz nicht hervorgerufen wird. Nährlösungen mit

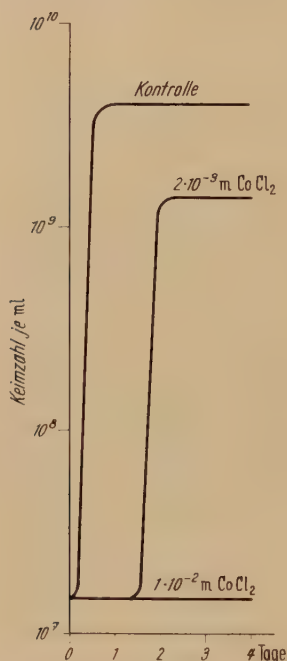


Abb. 1. Zellvermehrung von *Proteus vulgaris* unter dem Einfluß von Kobalt-Ionen (semilog. Maßstab)

einem Gehalt von Kobalt und Nicotinsäureamid im Verhältnis $4 \cdot 10^{-3}$ n : $8 \cdot 10^{-3}$ n, $4 \cdot 10^{-3}$ n : $4 \cdot 10^{-3}$ n, $8 \cdot 10^{-3}$ n : $10 \cdot 10^{-3}$ n und $8 \cdot 10^{-3}$ n : $12 \cdot 10^{-3}$ n zeigten keinerlei Abhängigkeit des Bakterienwachstums von erhöhter Nicotinsäureamid-Zufuhr. Nach mehrtägiger Bakterienkultur war freies Nicotinsäureamid — auch bei Verwendung eines neutralen Lösungsmittelgemisches (siehe oben) — immer noch in größeren Mengen papierchromatographisch nachweisbar. Das gesamte Kobalt der Nährlösung blieb hierbei fast genau an der Auftragsstelle zurück. Auch bei Markierung mit ^{60}Co ergab die autoradiographische Auswertung der Versuche keinen Anhalt für das Vorhandensein eines Kobalt-Nicotinsäureamid-Komplexes. Leider war über die Stabilität dieses Komplexes nichts bekannt; da jedoch nach den Angaben von SCHADE (1949) die Kobalt-Wirkung bei *Proteus vulgaris* von der Substratacidität weitgehend unabhängig ist (pH 5,6—7,3) und eigene Beobachtungen bei einem Anfangs- pH der Nährlösung von 4,5 eher auf eine Verstärkung als auf eine Verringerung

der Hemmwirkung gegenüber dem Neutralbereich deuteten, kann mit Sicherheit angenommen werden, daß eine Komplexverbindung von Kobalt und Nicotinsäureamid im oben genannten Lösungsmittelsystem kaum in größerem Ausmaße zerfallen würde, wenn sie in der Nährlösung die Ursache eines Vitaminmangels darstellte.

Um die Art, in der die Kobalt-Ionen von den Zellen angereichert werden, etwas genauer zu definieren, wurden *Proteus*-Kulturen nach Wachstum auf ^{60}Co -markiertem Substrat papierchromatographisch und autoradiographisch untersucht. Vergleichsweise wurden nebeneinander Gesamt-Homogenate und abzentrifugierte zelltrümmerfreie Zellprotein-Suspensionen auf die Papierstreifen aufgetragen. Dabei zeigte sich, daß

die Kobalt-Ionen der reinen Protein-Suspensionen als anorganische Ionen zur Kathode wanderten, während die Autoradiogramme der Gesamt-Homogenate maximale Radioaktivität an der Auftragsstelle aufwiesen, wo auch die Zellreste zurückgeblieben waren. Hieraus kann mit Sicherheit auf eine besonders starke Bindung des Kobalts an der Zellmembran geschlossen werden.

HEALY, CHENG u. McELROY (1955) fanden, daß Fe-Mangel und Kobalt-Zusatz in höheren Dosen bei *Neurospora* gleichsinnig auf die Enzym-Aktivität wirkten: Die Aktivität der eisenhaltigen Oxydationsfermente Katalase, Peroxydase und Cytochromoxydase, sowie die der Succinodehydrogenase und Isocitronensäure-dehydrogenase wurde herabgesetzt bei gleichzeitiger Zunahme von Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-, DPNase- und Nitratreductase-Aktivität.

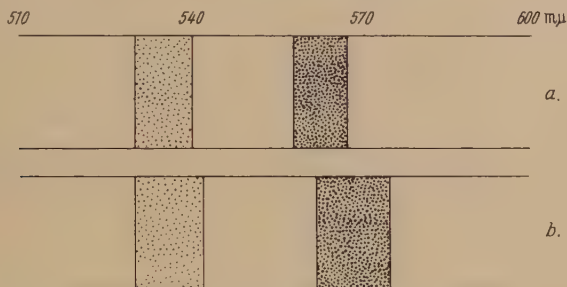


Abb. 2. Cytochrom-Spektrum von *Proteus vulgaris*;
a Kontrolle, flüssiges und festes Substrat; b Kobalt-Kultur, festes Substrat

Es lag nahe, eine entsprechende Wirkung des Kobalts auch gegenüber dem eisenhaltigen Fermentsystem von *Proteus* zu erwarten. Cytochrom-Bestimmungen ergaben, daß tatsächlich eine solche Beziehung bestand: Im Gegensatz zu den Beobachtungen von HOLLMANN u. THOFERN (1955) an dem ebenfalls zu den gramnegativen Enterobacteriaceen gehörenden *Paracolobactrum arizona* wurde bei *Proteus* kein durch verschiedenartige Belüftungsverhältnisse bedingter Unterschied im Cytochromsystem festgestellt. Der auf dieses ausgeübte Einfluß der Kobalt-Ionen war dagegen deutlich; bei flüssiger Kultur verschwanden hier die Absorptionsbanden völlig, während sie bei Agar-Kultur eine charakteristische Verschiebung gegen den langwelligen Bereich aufwiesen (vgl. Abb. 2). Im Gegensatz zum Kobalt bewirkten Lithium und Caesium keine erkennbare Veränderung des Cytochrom-Spektrums.

Als weiteres eisenhaltiges Ferment wurde die Katalase des Test-organismus in ihrer Beeinflußbarkeit durch Kobalt-Ionen untersucht.

Aus Tab. 1 geht hervor, daß die Katalaseaktivität von *Proteus* durch Kobalt-Ionen im untersuchten Konzentrations-Bereich beträchtlich herabgesetzt, wenn auch nicht völlig blockiert wird. Wie beim Vergleich der bei Bestimmung mit und ohne Zusatz von Kobalt gefundenen

Katalase-Aktivitäten zweier völlig gleichartiger, aus der gleichen Kultur stammenden Bakteriensuspensionen besonders deutlich wurde, handelt es sich offenbar um eine Blockierung der Katalase-Wirkung, nicht aber um die Blockierung ihrer Synthese¹.

Tabelle 1. *Einfluß von Co⁺⁺-Ionen auf die Katalase-Aktivität von Proteus vulgaris*
(3 Tage alte Kultur)

Art der Kultur	Katalase-Aktivität ¹
Kontrolle flüssig	32,0
Kobalt-Kultur ($2 \cdot 10^{-3}$ m), flüssig	8,6
Kobalt-Kultur ($2 \cdot 10^{-3}$ m), flüssig, Bestimmung in Gegenwart von Co ⁺⁺ -Ionen in 10^{-3} m Konzentration	7,0
Kobalt-Kultur ($1 \cdot 10^{-3}$ m), Agar	6,3

$$^1 \text{ Bestimmt als } K = \frac{\text{mg H}_2\text{O}_2\text{-Verbrauch in 30 Minuten}}{\text{mg Bakterien-Trockengewicht}}$$

Diese Auffassung wurde auch durch die Feststellung gestützt, daß die Bakterien weder in Gegenwart noch in Abwesenheit von Kobalt größere, quantitativ erfaßbare Porphyrin-Mengen ausschieden.

Diskussion

Die Blockierung des eisenhaltigen Fermentsystems von *Proteus vulgaris* erscheint nach obigen Befunden als wesentlicher Effekt der Kobalt-Hemmung. Es ist leicht vorstellbar, daß die Sauerstoff-Empfindlichkeit der Kobalt-Kulturen mit einer Peroxyd-Vergiftung der Zellen in Verbindung gebracht werden kann; durch Kobalt in einer bestimmten Grenzkonzentration würde *Proteus* in einen Anaerobier im Sinne von RIPPEL-BALDES (1955, S. 178) umgewandelt (vgl. oben angeführtes Beispiel *Bac. asteroides*). Die Besonderheiten des in Abb. 1 dargestellten Wachstumsverlaufs von *Proteus* in $2 \cdot 10^{-3}$ m CoCl₂ enthaltender Nährlösung lassen sich, ebenso wie das Kleinerwerden der Zellen, aus der Umstellung von der aeroben zur weniger rationellen anaeroben Atmung ohne weiteres erklären; entsprechende Veränderungen sind ja auch von anderen Mikroorganismen bekannt.

Bemerkenswert ist noch die Tatsache, daß in den flüssigen *Proteus*-Kulturen bei Gegenwart von Kobalt keine Cytochromanden mehr gefunden wurden, während die Katalase-Aktivität, wenn auch stark herabgesetzt, noch in gut bestimmbar Mengen vorhanden war. Diese Beobachtung steht in gewissem Sinne in Parallele zu Feststellungen von

¹ Demgegenüber berichten M. T. LAFORET und E. D. THOMAS [J. biol. Chem. **218**, 595 (1956)] über eine durch Kobalt-Ionen bedingte Hemmung der Häm-synthese im Knochenmark.

JENSEN u. THOFERN (1953), die bei Blockierung des Cytochromsystems einer häminbedürftigen Staphylokokken-Mutante durch einen Kobalt-Porphyrin-Komplex keine Beeinträchtigung der Katalase-Aktivität fanden. Selbstverständlich kann man die Atmungshemmung nicht als die einzige Wirkung der Kobalt-Ionen auf den Stoffwechsel der Bakterien betrachten. Die durch höhere Konzentrationen des Schwermetalls bewirkte Bakteriostase ist zweifellos im wesentlichen durch Eiweiß-Komplex-Bildung bedingt. Andererseits wirkt Kobalt in geringerer Konzentration nicht nur auf Pilze und Actinomyceten (vgl. DÖLLE 1957), sondern auch auf Bakterien wachstumsfördernd (GORBACH, DEDIC u. KOCH 1955).

PRINCIPE u. THORNBERRY (1952) fanden bei *Streptomyces griseus* unter Kobalt-Wirkung eine Erhöhung der Streptomycin-Produktion. Hierfür wird mit Sicherheit eine Blockierung des Cytochromsystems verantwortlich zu machen sein, nachdem DÖLLE (1957) nachgewiesen hat, daß *Streptomyces purpurascens* Lindenbein dieses bei starker Rhodomycinbildung nicht besitzt, während nicht-rhodomycinbildende Stämme der gleichen Art deutliche Cytochrombanden aufweisen.

Zusammenfassung

1. Co^{++} -Ionen in $2 \cdot 10^{-3}$ m Konzentration bewirkten bei weitgehend anaerober flüssiger Kultur ein völliges Verschwinden der Cytochrombanden von *Proteus vulgaris* Hauser, während die Katalase-Aktivität auf etwa ein Viertel des Normalwertes herabgesetzt wurde. Nach Verlängerung der Lag-Phase erreichte die maximale Zellzahl unter Kobalt-Wirkung nur etwa ein Drittel des Kontrollwertes; gleichzeitig wurde eine deutliche Verkleinerung der Zellen beobachtet.

2. Agar-Kultur bei gleichmolarer Co^{++} -Ionen-Konzentration bewirkte völlige Bakteriostase und rasch einsetzende Autolyse; bei $1 \cdot 10^{-3}$ m Konzentration konnte noch Bakterienvermehrung festgestellt werden, wobei die Cytochrombanden eine charakteristische Verschiebung in den langwelligen Bereich aufwiesen und die Katalase-Aktivität annähernd auf den gleichen Wert reduziert war wie bei oben genannter flüssiger Kultur.

3. Eine durch Co^{++} -Ionen bedingte Porphyrin-Ausscheidung konnte nicht nachgewiesen werden.

4. Elektrophorese-Versuche machten es wahrscheinlich, daß eine Komplex-Bindung von Kobalt-Ionen bei *Proteus vulgaris* hauptsächlich an Zellwandbestandteilen erfolgt.

5. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen wurden Kobalt-Nicotinsäureamid-Komplexe nicht in feststellbarer Menge gebildet; Kobalt-Zusatz bedingte keinen Mangel an freiem Nicotinsäureamid.

Für wertvolle Hinweise und praktische Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. A. RIPPEL-BALDES, Frau Prof. Dr. A. WINKLER und Herrn Dr. E. THOFERN.
Ausgeführt mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Literatur

- BELOSERSKI, A. N.: Mikrobiologija **10**, 185 (1939). — BERTI, T., e L. CIMA: Giorn. Microbiol. **4**, 317 (1956). — DEDIC, G. A., u. O. G. KOCH: Arch. Mikrobiol. **23**, 130 (1955). — DÖLLE, H.: Arch. Mikrobiol. (im Druck). — FUJITA, A., u. T. KODAMA, Biochem. Z. **273**, 186 (1934). — GÖTTE, H.: Bestimmung und Anwendung der radioaktiven Atomarten in der organischen Chemie, in „Methoden der Organ. Chemie“ (Houben-Weyl) 4. Aufl. 1955, S. 757. — GORBACH, G., G. A. DEDIC u. O. G. KOCH: Arch. Mikrobiol. **22**, 78 (1955). — GRASSMANN, W., u. K. HANNIG: Hoppe-Seylers Z. **290**, 1 (1952). — GRASSMANN, W., K. HANNIG u. M. KNEDEL: Dtsch. med. Wschr. **1951**, 333. — HOLLMANN, S., u. E. THOFERN: Naturwissenschaften **42**, 586 (1955). — JENSEN, J., u. E. THOFERN: Z. Naturforsch. 8b, 697 (1953). — KÖRVER, G.: Klin. Wschr. **28**, 693 (1950); **31**, 1036 (1953). — NEYLAND, M., P. DUNKEL and A. L. SCHADE: J. Gen. Microbiol. **7**, 409 (1952). — PAPPENHEIMER, A. M., jr.: J. of Biol. Chem. **167**, 251 (1947). — PETRAS, E.: Untersuchungen über den Nucleinsäure- und Phosphat-Haushalt von Mikroorganismen. Diss. der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen 1957. Ein größerer Auszug der sonstigen Ergebnisse erscheint später im Arch. f. Mikrobiologie. — PRINCIPE, P. A., and H. H. THORNBERRY: Phytopathology **42**, 123 (1952). — RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie, 3. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — SCHADE, A. L.: J. Bacter. **58**, 811 (1949). — SUMNER, J. B., and G. F. SOMERS: Chemistry and Methods of Enzymes. Academic Press Inc. Publishers, New York, N. Y. 1953. — TALTS, J.: Protoplasma **15**, 188 (1932). — TIDDENS, H. G.: Dissert. Göttingen 1957. — VOGEL, H.: Chemie und Technik der Vitamine. Stuttgart: Ferdinand Enke 1955.

(From the Department of Bacteriology, State Laboratory for Soil and Crop Research, Lyngby, Denmark)

Biological Transformation of Thiourea

By

H. L. JENSEN

(Eingegangen am 7. August 1957)

Comparatively little is known about the biological transformation of thiourea which exerts a general toxic effect in the animal organism and inhibits certain oxidizing enzymes in plants (see CROCKER 1948), probably through its chelating effect on copper. To higher plants thiourea seems unavailable as a source of nitrogen and also toxic (NICOLAS and NICOLAS 1925), and it is strongly inhibitory to *Nitrosomonas* in soil (QUASTEL and SCHOLEFIELD 1951) as well as *in vitro* (LEES 1952, JENSEN and SÖRENSEN 1952). Its effect on heterotrophic organisms is less pronounced; KLÖPPING (1951) found the growth of a few species of fungi checked by 200 to 10,000 p.p.m. (0.0026 to 0.132 molar) thiourea.

Occurrence of thiourea in higher plants has sometimes been reported; KJAER (personal communication) was unable to confirm this, but substituted thioureas may arise through reaction between certain amides and naturally occurring isothiocyanates (KJAER and GMELIN 1956). OVCHAROV (1938) stated that certain fungi synthesize thiourea in synthetic media with ammonia, asparagine or protein (but not nitrate) as nitrogen source, but the specificity of the qualitative reactions employed seems open to doubt.

Thiourea is apparently not readily decomposed by biological agencies. According to NICOLAS and NICOLAS (1925) it is not hydrolyzed by soy bean urease. MUNRO (1886), KASTLE and ELVOLVE (1904) and BEESLEY (1914) found no nitrification of thiourea by impure cultures of nitrifying bacteria even after very long incubation, and its inhibition of soil nitrification is quite protracted (QUASTEL and SCHOLEFIELD 1951). It was further found unserviceable as source of nitrogen to penicillia, yeasts and mixed cultures of fungi and bacteria by KASTLE and ELVOLVE (1904), as source of sulphur to *Aspergillus niger* by STEINBERG (1941), and as source of energy to the autotrophic *Thiobacillus thiocyanoxidans* by YOUATT (1954).

Positive findings of thiourea metabolism have rarely been reported. TANNER (1917—1918) stated that several bacteria, yeasts and related

fungi produce sulphide from thiourea. RIPPEL (1925) found *Aspergillus niger* unable to use thiourea as sole nitrogen source, but a small fraction of its sulphur was oxidized to sulphate in the presence of nitrate. DEN DOOREN DE JONG (1926) observed a moderate to sparse growth of a few bacteria, e.g., *Aerobacter aerogenes*, on glucose-thiourea-agar, and non-exacting strains of *Corynebacterium diphtheriae* can according to BRAUN (1938) use thiourea as an inferior substitute for cystine. FULLER et al. (1950) report that 100 p.p.m. thiourea-nitrogen was slowly nitrified and 200 p.p.m. slowly converted into ammonia during 10—14 weeks in alkaline soil. FREDERICK et al. (1957) found only 9% of the sulphur in thiourea (added in the rather large dose of 1%) oxidized to sulphate after 21 weeks in soil of pH 6.1, where the numbers of microorganisms were strongly depressed for 42 weeks; no significant sulphate formation was observed on perfusion of the same soil for six weeks with a 0.5% thiourea solution.

The present contribution deals with the metabolization of thiourea by fungi encountered in experiments on the behaviour of this compound in soil—a problem to which its suggested use as a fly larvicide in dungheaps lends some actuality.

I. Isolation and methods

Microorganisms utilizing thiourea as nitrogen source were isolated by plating on a medium of basal glucose solution (see below) + 0.05% thiourea and 2% agar, either directly from soil or else after enrichment in soil-infected glucose-thiourea-solution. The following fungi showed evidence of activity: 1—2: two non-identified green aspergilli of the *A. glaucus* group. 3: a green penicillium of the *P. citrinum* group. 4: *Trichoderma viride*. 5—6: two unidentified *Dematiaceae*, here called Fungus Th. 5 and Fungus Th. 6. None of these fungi produced more than a trace of growth in sugar-free thiourea solution.

A few strains of bacteria, particularly a fluorescent and rather weakly proteolytic *Pseudomonas*, showed in the primary culture a definitely better growth on glucose-thiourea agar than on corresponding nitrogen-free medium, but this property was lost after a few transfers. These organisms were not studied any further.

The following basal medium was used: Glucose 20.0 gm.; K_2HPO_4 1.0 gm.; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 gm.; $CaSO_4$ 0.2 gm.; $FeSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.05 gm.; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 mgm.; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.75 mgm.; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1.5 mgm.; in 1000 ml. distilled water. The medium was dispensed in 300-ml.-Erlenmeyer flasks, mostly in portions of 40 or 50 ml., and autoclaved, whereupon thiourea was added from stock solutions sterilized by filtration. Cultures of *Aspergillus* and *Penicillium* were incubated at 28—30° C, the others at 25° C. After growth the mycelium was carefully collected, washed, dried, and weighed, or else nitrogen was determined directly in the moist mycelium after washing.

Nitrogen determinations in mycelium and culture filtrates were made by the Kjeldahl method; the micro-modification (Parnas-Wagner) was used when nitrogen contents less than 0.5 mgm. were expected. Sulphate was determined gravimetrically after precipitation as barium salt. Unless specified, the data in the subsequent tables represent averages of duplicate cultures.

II. Experimental results

1. Utilization of thiourea as nitrogen source

A tentative experiment with *Aspergillus A* (Table 1) shows that thiourea is a rather inferior source of nitrogen which allows only a slow rate of growth and a production of mycelium less than one-half of that obtained with ammonia-nitrogen offered in nearly the same quantity (7.28 mgm., of which 78% was assimilated) as thiourea-nitrogen (7.37 mgm. of which 38% was assimilated).

Table 1. *Growth of Aspergillus A with thiourea as source of nitrogen.*
(40 ml. medium, 2.0% glucose)

Source of nitrogen	Dry weight of mycelium mgm			N-content of mycelium mgm after 21 days
	7 days	14 days	21 days	
N-free medium	1.1	1.3	1.4	0.013
Thiourea 0.05%	9.6	40	88	2.52
NH ₄ -acetate 0.10% . .	190	219	208	5.67

Varying concentration of thiourea was tested in another tentative experiment (Table 2) which shows that 0.05 and 0.10% thiourea have almost the same effect; 0.20% thiourea causes a delayed growth which after 4 weeks reaches much the same extent as with the lower concentrations. Distillation of the combined filtrates and washings from the mycelia with magnesium oxide showed only insignificant amounts of ammonia-nitrogen (0—0.04 mgm.) in the cultures as well as in sterile control media.

Table 2. *Growth of Aspergillus A with varying concentration of thiourea.*
(50 ml. medium, 2.0% glucose)

Thiourea %	Dry weight of mycelium mgm				N-content of mycelium mgm after 28 days
	7 days	14 days	21 days	28 days	
0.05	9	46	66	68	1.58
0.10	12	40	66	69	1.69
0.20	6	17	33	63	1.60

The slow increase in mycelial growth and the incomplete uptake of thiourea-nitrogen might suggest that the decomposition of thiourea is accompanied by loss of nitrogen in gaseous form. A more elaborate experiment was therefore performed with the two *Aspergilli* and the *Penicillium* at a lower thiourea concentration. As seen in Table 3, the uptake of nitrogen within approx. six weeks is again less than one-half in *Aspergillus A*, and less than one-third in the two others. The sum of nitrogen in the mycelia and culture fluids agrees, within the expected

limits of error, with the amount of thiourea-nitrogen originally added. There is thus no indication that nitrogen was lost or converted into a form not detectable by the Kjeldahl method.

An additional experiment was made with *Aspergillus A* in medium with still lower thiourea concentrations. Table 4 shows that the amount of mycelium nitrogen is roughly proportional to that of added thiourea, and the uptake is not greater than from the higher thiourea concentrations.

Table 3. *Utilization of thiourea by Aspergillus and Penicillium.* (40 ml. medium, 2.0% glucose, 0.025% thiourea, theoretical N-content of thiourea, 3.68 mgm.)

Organism and initial N mgm found	Inc. days	Dry weight of mycelium mgm	N per culture mgm in		
			Mycelium	Filtrate	Total
<i>Aspergillus A</i> N: 3.45 mgm.	14	14	0.54	3.02	3.56
	21	52	1.30	2.20	3.50
	28	58	1.39	2.15	3.54
	40	75	1.70	1.92	3.62
<i>Aspergillus B</i> N: 3.66 mgm.	14	13	0.48	3.27	3.75
	30	34	0.72	3.07	3.79
	45	48	1.01	2.67	3.68
<i>Penicillium sp.</i> N: 3.82 mgm.	14	18	1.00	2.77	3.77
	28	31	1.03	2.77	3.80
	45	40	1.14	2.82	3.96

Table 4. *Utilization of thiourea in low concentration by Aspergillus A*
(40 ml. medium, 2.0% glucose)

Thiourea %	N in mycelium mgm			Uptake of thiourea-N ¹ % after 35 days
	10 days	20 days	35 days	
0	—	—	0.018	—
0.0025	0.058	—	0.074	15
0.005	0.096	0.141	0.154	19
0.010	0.207	0.285	0.53	36

¹ N-content of mycelium from N-free medium subtracted.

The three remaining fungi, which grew more sparsely, were tested in medium with 0.02—0.025% thiourea. *Trichoderma viride* and Fungus *Th. 5* assimilated only 4—5% of the added nitrogen, while 16% was assimilated by Fungus *Th. 6*, within 45 days. Addition of soil extract to the medium resulted in a somewhat better mycelial growth but no greater uptake of thiourea-nitrogen.

All six fungi were tested in an experiment with very low thiourea-concentration (Table 5). Even under these conditions the thiourea is far from quantitatively utilized. The nitrogen uptake by *T. viride* and Fungus *Th. 5* is indeed better but that by the *Aspergilli* and the *Peni-*

cellium lower than at higher thiourea concentration. Tests of the culture filtrates with GROTES reagent (GROTE 1931) showed that the thiourea had almost completely disappeared and must have undergone some transformation other than assimilation by the fungi.

Table 5. *Utilization of thiourea in very low concentration*
(100 ml. medium, 1.0% glucose, 0.001% thiourea = 0.368 mgm. N)

Organism	Incubation days	N in mycelium mgm		Uptake of thiourea-N %
		+ thiourea	-N	
<i>Aspergillus A</i>	14	0.073	0.012	17
	40	0.072	0.013	16
<i>Aspergillus B</i>	14	0.060	0.014	12
	40	0.068	0.015	14
<i>Penicillium</i> sp.	14	0.099	0.007	25
	40	0.083	0.011	20
<i>Trichoderma viride</i>	18	0.054	0.005	13
	42	0.047	0.010	10
Fungus <i>Th. 5</i>	15	0.048	0.004	12
	45	0.057	0.008	13
Fungus <i>Th. 6</i>	15	0.061	0.010	14
	45	0.085	0.008	21

Very long periods of incubation were tried in a final experiment. *Aspergillus A*, *Penicillium* sp. and Fungus *Th. 6* were grown for about 15 weeks, during which time the evaporation losses were approximately restored by periodical addition of sterile distilled water. As seen in Table 6, again little more than one-fourth to one-third of the thiourea-nitrogen is assimilated after 46 days, and rather less than one-half after 102 days. At the final stage, however, the sums of nitrogen in mycelia and filtrates tend to be higher than the initial, probably owing to uptake of some combined nitrogen from the air during the prolonged incubation. Tests with GROTES reagent showed that very little thiourea remained in the medium even after 46 days, when comparisons with thiourea solutions of known concentration suggested a content not exceeding 0.001—0.002% thiourea. The greater part of the nitrogen in the filtrates was apparently present as unknown transformation products of the thiourea (Table 6).

2. Oxidation of thiourea-sulphur

The metabolization of thiourea would be expected to involve a transformation of its sulphur. Several heterotrophic microorganisms are known to oxidize reduced sulphur compounds to sulphate (see RIPPEL 1925, STARKEY 1956, FREDERICK et al. 1957). Tentative experiments with *Aspergillus A* suggested the same effect on thiourea, and this was confirmed by other experiments in glucose-thiourea medium where

calcium was omitted and magnesium and iron supplied as chlorides; thiourea thus served as simultaneous source of nitrogen and sulphur (beside the traces of sulphate added with the heavy metals). The mycelia were harvested as usual, and sulphate was determined in the combined filtrates and washings. The results in Table 7 show that *Aspergillus A* and *Penicillium* sp. form small but significant amounts of sulphate,

Table 6. *Utilization of thiourea by long incubation.* (50 ml. medium, 2.0% glucose, 0.01% thiourea. Initial N-content in thiourea 1.84 mgm., in basal medium 0.04 mgm., total 1.88 mgm.)

Organism	<i>Aspergillus A</i>		<i>Penicillium</i> sp.		Fungus Th. 6	
	a	b	a	b	a	b
After 46 days						
Dry mycelium mgm.	42.3	40.9	24.9	31.3	15.6	15.5
N in mycelium mgm.	0.58	0.55	0.68	0.66	0.46	0.47
N in filtrate mgm.	1.30	1.31	1.26	1.23	1.59	1.48
Total N mgm.	1.88	1.86	1.92	1.89	2.05	1.94
After 102 days						
Dry mycelium mgm.	52.1	49.9	45.9	52.6	20.0	34.4
N in mycelium mgm.	0.91	0.79	0.84	0.86	0.58	0.79
N in filtrate mgm.	1.07	1.53	1.19	1.27	1.43	1.28
Total N mgm.	1.98	2.32	2.03	2.13	2.01	2.07
Uptake of thiourea-N						
% after 46 days	32	30	37	36	25	26
% after 102 days	49	43	46	47	32	43

while the effect of the more weakly growing strain *Aspergillus B* is scarcely significant. The amount of sulphur added with the heavy metals corresponds to only 0.09 mgm. per 100 ml.; the bulk of the sulphate in the sterile control media presumably consists of impurities, or may have arisen by slight chemical oxidation of the thiourea. The two active strains convert in 50 days roughly 15–17% of the thiourea-sulphur into sulphate; this is considerably more than found by RIPPEL (1925) in *Aspergillus niger* which did not utilize thiourea-nitrogen. It is also noteworthy that nitrogen is assimilated and sulphur oxidized in approximate stoichiometric proportion (ratio 0.62–1.14, theoretically 0.875).

An additional experiment on the general sulphur-oxidizing power of the fungi was made in sulphate-free medium (zinc, manganese and copper sulphates omitted) with cystine as simultaneous source of nitrogen and sulphur. A strain of *Aspergillus niger* was included for comparison. Table 8 shows the results after 14 days' incubation. *A. niger* grows vigorously and oxidizes most of the sulphur. The growth of the other fungi is only moderate to scant, but sulphate is formed in all cases, and when the results are expressed on the basis of weight of synthesized mycelium, at least the two green *Aspergilli A* and *B* appear little less active than *A. niger*.

Table 7. *Oxidation of thiourea-sulphur by Aspergillus and Penicillium.*
(100 ml. medium, 2.0% glucose, 0.05% thiourea = 18.4 mgm. N and 23.8 mgm. S)

Organism	<i>Asp. A</i>	<i>Asp. B</i>	<i>Penicillium</i>
After 20 days			
(Number of replicates)	(2)	(2)	(3)
Dry mycelium mgm.	110	16	28
N in mycelium mgm.	2.55	0.248	1.49
SO ₄ -S in filtrate mgm.	2.54	0.33	2.73
SO ₄ -S excess over sterile control (oxidized S) ¹	2.23	(0)	2.42
Ratio $\frac{\text{assimilated N}}{\text{oxidized S}}$	1.14	—	0.62
After 50 days			
(Number of replicates)	(2)	(3)	(3)
Dry mycelium mgm.	116	48	72
N in mycelium mgm.	2.57	0.58	3.54
SO ₄ -S in filtrate mgm.	4.06	0.69	4.41
SO ₄ -S excess over sterile control (oxidized S) ¹	3.67	(0.30)	4.02
Ratio $\frac{\text{assimilated N}}{\text{oxidized S}}$	0.70	—	0.88

¹ SO₄-S in sterile medium 20 d. (5 repl.): 0.14—0.41, mean 0.31 mgm.

SO₄-S in sterile medium 50 d. (6 repl.): 0.26—0.63, mean 0.39 mgm.

Table 8. *Oxidation of cystine-sulphur.* (100 ml. medium, 2.0% glucose, 0.10% cystine)

Organism	Dry mycelium mgm	SO ₄ -S in filtrate mgm	Cystine-S oxidized to SO ₄	
			%	mgm per gm mycelium
<i>Aspergillus A</i> a)	150	5.5	21	37
b)	151	4.5	17	30
<i>Aspergillus B</i> a)	119	4.5	17	38
b)	128	5.9	22	46
<i>Penicillium</i> a)	80	2.2	8	26
b)	55	1.1	4	20
<i>Asp. niger</i> a)	406	22.0	83	54
b)	343	19.7	74	57
Sterile medium	—	<0.02	—	—

III. Conclusions

Thiourea can according to the present experiments obviously be used by certain fungi as a source of nitrogen, although an inferior one which allows only a slow growth and never appears to be quantitatively assimilated. The reason why no more than one-half and usually much less thiourea-nitrogen was recovered in the mycelium is somewhat obscure. It might be imagined that the thiourea-molecule becomes available through reversion of the process $\text{NH}_4\text{SCN} \rightarrow \text{CS}(\text{NH}_2)_2$, and that only the ammonium radical of the ammonium thiocyanate is utilized. This hypothesis seems

supported by the fact that a separate experiment showed all six strains of fungi unable to use potassium thiocyanate as a source of nitrogen, although some fungi do possess this property (Kossowicz 1914). Nevertheless the hypothesis appears untenable, firstly because no thiocyanate reaction with ferric chloride was detected in the culture fluids, and secondly in view of the fact that sulphur is oxidized in amounts roughly proportional to those of assimilated nitrogen. It seems possible that the unknown nitrogen compounds in the culture filtrates are a mixture of miscellaneous products of excretion and cell autolysis during the long continued growth, and that some thiourea-nitrogen in addition to that recovered in the mycelium has gradually passed through the mycelial stage.

Summary

Six strains of fungi: two *Aspergilli* of the *A. glaucus* group, *Penicillium* sp., *Trichoderma viride*, and two unidentified dark fungi, were found able to use thiourea as a source of nitrogen. One of the *Aspergilli* and the *Penicillium* showed the best utilization, but the growth was always slow, and no more than 50% (usually much less) of the thiourea-nitrogen was recovered in the mycelium.

Assimilation of thiourea-nitrogen by *Aspergillus* and *Penicillium* was accompanied by oxidation of the sulphur to sulphate in roughly approximate stoichiometric proportion. The same fungi were able to produce sulphate from cystine as combined source of nitrogen and sulphur.

References

- BEESELEY, R. M.: J. Chem. Soc. (Lond.) **105**, 1014—1024 (1914). — BRAUN, H.: Schweiz. Z. Allg. Path. **1**, 113—120 (1938). — CROCKER, W.: Growth of Plants. Reinhold Publ. Co., New York 1948. — DEN DOOREN DE JONG, L. E.: Bijdrage tot de kennis van het dissimilatieproces. Diss. Delft 1926. — FREDERICK, L. R., R. L. STARKEY and W. SEGAL: Soil Sci. Soc. Amer. Proc. **21**, 287—292 (1957). — FULLER, W. H., A. B. CASTER and W. McGEORGE: Arizona Agr. Exp. Stat. Techn. Bull. No. 120 (1950). — GROTE, I. W.: J. of Biol. Chem. **93**, 25—30 (1931). — JENSEN, H. L., and H. SØRENSEN: Acta agricult. scand. (Stockh.) **2**, 295—304 (1952). — KASTLE, J. H., and E. ELVOLVE: Amer. Chem. J. **31**, 550—557 (1904). — KJAER, A., and R. GMELIN: Acta chem. scand. (Copenh.) **10**, 1100—1110. 1358—1359 (1956). — KLÖPPING, H. L.: Chemical constitution and antifungal action of sulphur compounds. Diss. Utrecht 1951. — KOSSOWICZ, A.: Biochem. Z. **67**, 391—399 (1914). — LEES, H.: Biochem. J. **52**, 134—139 (1952). — MUNRO, J. H. M.: J. Chem. Soc. (Lond.) **49**, 632—681 (1886). — NICOLAS, E., et G. NICOLAS: C. r. Acad. Sci. (Paris) **180**, 1286—1289 (1925). — OVCHAROV, K. E.: C. R. (Doklady) Acad. Sci. URSS **16**, 461—464 (1937). — QUASTEL, J. H., and P. G. SCHOLEFIELD: Bacter. Rev. **15**, 1—53 (1951). — RIPPEL, A.: Biochem. Z. **165**, 473—474 (1925). — STARKEY, R. L.: Industr. Engin. Chem. **48**, 1429—1437 (1956). — STEINBERG, R. A.: J. Agricult. Res. **63**, 109—127 (1941). — TANNER, F. W.: J. Bacter. **2**, 585—593 (1917); J. Amer. Chem. Soc. **40**, 663—669 (1918). — YOUATT, J. B.: J. Gen. Microbiol. **11**, 139—149 (1954).

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen)

Über Wachstumsversuche mit Rot- und Grünalgen (*Porphyridium cruentum*, *Trailliella intricata*, *Chlorella pyrenoidosa*) in verschiedenfarbigem, energiegleichen Licht

Von

RICHARD HARDER und BARBARA BEDERKE

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Juni 1957)

Die Vorstellungen über die Ursache für die Verteilung der farbigen Algen in den verschiedenen Meerestiefen fußen fast ausschließlich auf Untersuchungen ihrer Photosynthese in Licht verschiedener Wellenlänge und Intensität (HARDER 1923, EHRKE 1932, MONTFORT 1934, SEYBOLD 1934, SCHMIDT 1937). Der Meinungsstreit zwischen ENGELMANN-GAIDUKOV einerseits, die die Lichtfarbe am Standort für ausschlaggebend ansahen, und BERTHOLD-OLTMANNs andererseits, nach denen die Schwächungen der Lichtintensität mit zunehmender Meerestiefe die größere Bedeutung haben soll, ist heute dahin entschieden, daß beide Faktoren wirksam sind, daß aber das Schwergewicht auf der Wellenlänge des Lichtes liegt.

Diese Ergebnisse über die Kohlensäureassimilation stellen jedoch noch keinen Beweis für die Richtigkeit der Engelmanschen Theorie über die natürliche Tiefenverteilung der Algen im Meere dar; denn man darf Wachstum und Entwicklung nicht ohne weiteres gleich Photosynthese setzen. Das Licht könnte sich auch noch auf die Plasmapermeabilität, die Stoffaufnahme, die Atmung, die Zellteilung, die Formbildung, die Fortpflanzung und anderes auswirken. Es sei nur daran erinnert, wie außerordentlich verschieden die Entwicklung von Lang- und Kurztagpflanzen bei täglich völlig gleicher Dauer wie Intensität der Beleuchtung ist. Wie unerwartet verschieden Pflanzen auf Licht verschiedener Wellenlänge reagieren können, geht unter anderem aus den Versuchen von VINCE (1956) hervor, nach denen die Internodienlänge, die totale Stammlänge sowie die Blattgröße im farbigen Licht bei *Lycopersicum esculentum* sich mit zunehmender Wellenlänge vergrößern, während bei *Pisum sativum* var. *Meteor* zwar die Blattlänge ebenfalls zunimmt, Internodien- und Stammlänge sich aber vermindern; *Pisum sativum* var. *Alaska* reagiert wieder noch anders. Weitere Literatur bei WASSINK u. STOLWIJK (1956) u. a. Wenn auch die Verhältnisse bei den höheren Pflanzen zweifellos verwickelter liegen als bei den niederen, besonders den einzelligen Algen, so brauchen sich doch auch bei letzteren photosynthetische Leistung und Wachstum nicht zu decken. Das zeigt unter anderem die Diskussion über die Möglichkeit einer Wachstumssteigerung in Massenkulturen von *Chlorella* durch Maßnahmen zur Steigerung der Photosynthese (Literatur bei PIRSON 1953, S. 328). Auch HAXO u. BLINKS (1950,

S. 420) weisen darauf hin, daß die Verteilung der Algen im Meer durch viele Faktoren beeinflußt wird, die jeder einzeln berücksichtigt werden müssen, und nach BAATZ (1940/41) wirkt farbiges Licht längerer Versuchsdauer bei Diatomeen spezifisch auch auf Bau, Vitalität und Auxosporenbildung.

Der Entscheid über den Einfluß der Wellenlänge des Lichtes auf das Wachstum der Algen läßt sich also nur durch Kulturversuche treffen. Darüber findet man aber, vor allem wegen der Schwierigkeit der Kultivierung der roten Meeresalgen, in der Literatur sehr wenig. Nur BAATZ (1940/41) hat Vergleichskulturen mit einigen Grünalgen und mehreren Meeresdiatomeen angestellt; Zellvermehrung, Stoffproduktion und Photosynthese waren bei den braungelben Diatomeen im grünen und blauen Licht besser als bei den Grünalgen, während im roten Licht die Grünalgen den Diatomeen überlegen waren. Mit Rotalgen sind vergleichende Wachstumsversuche in farbigem Licht aber überhaupt noch nicht gemacht worden. Seit KOCH (1950, 1953) in unserem Institut Rotalgen erfolgreich kultiviert und sogar zu Massenentwicklung gebracht hat, bereitet es nun keine Schwierigkeit mehr, auch Wachstumsversuche mit Rotalgen zu machen. Die nachstehenden Versuche sollen die bestehende Lücke ausfüllen.

I. Versuchspflanzen und Methodik

Als grünes Versuchsobjekt diente der bakterienfreie Stamm Nr. 211/8 E von *Chlorella pyrenoidosa* aus der Pringsheimschen Sammlung im Göttinger Pflanzenphysiologischen Institut. Die Rotalgenversuche wurden hauptsächlich mit dem ebenfalls bakterienfreien Einzeller *Porphyridium cruentum* (Bangioideae) durchgeführt (KOCH 1953). Außerdem wurden noch einige ergänzende Versuche mit *Trailliella intricata* gemacht, einer verzweigten Fadenfloridee (KOCH 1950). *Trailliella* war nicht bakterienfrei, machte aber makro- wie mikroskopisch einen sehr sauberen Eindruck.

Die Versuchsalgen wurden Stammkulturen entnommen, die in einem Dunkelmzimmer bei 770 Lux, gelegentlich auch nur 380 Lux, vor einer mit fließendem Wasser gekühlten elektrischen Osram-Glühlampe standen; sie erhielten täglich 16 Std Licht (von 6—22 Uhr). Die Nährsubstrate für die Stammkulturen und die Wachstumsversuche in farbigem Licht waren nicht ganz gleich:

1. *Porphyridium cruentum*.

a) Stammkultur: 1000 cm³ Aqua Quarz¹; 1000 cm³ Seewasser (3,2‰ ig, hergestellt aus Seesalz); 2 g Hefeextrakt (Difko); 2 g Trypton; 0,4 g KNO₃; 0,04 g KH₂PO₄; 0,04 g MgSO₄ · 7 H₂O; 200 cm³ Erddekot; 1,5‰ gewässerter Agar.

b) Lösung für Wachstumsversuche: 1000 cm³ Aqua Quarz; 1000 cm³ Seewasser; 0,01 g Eisencitrat; 0,01 g Citronensäure; 3 g KNO₃; 0,1 g KH₂PO₄; 0,8 g MgSO₄ · 7 H₂O; 40 cm³ Erddekot.

2. *Chlorella pyrenoidosa*.

a) Stammkultur: 1000 cm³ Aqua Quarz; 1 g Pepton; 0,2 g KNO₃; 0,02 g KH₂PO₄; 0,02 g MgSO₄ · 7 H₂O.

¹ In einer Quarzapparatur destilliertes Wasser.

b) Lösung für Wachstumsversuche: 1000 cm³ Aqua Quarz; 0,005 g Eisencitrat; 0,005 g Citronensäure; 2,5 g KNO₃; 1,25 g KH₂PO₄; 1,25 g MgSO₄ · 7 H₂O; 0,25 g Ca(NO₃)₂; 0,0015 g MnSO₄; 0,001 g ZnSO₄; 50 cm³ Erddekot; pH 5,3—5,4.

3. *Trailliella intricata*. Für Stammkultur wie für Wachstumsversuche: 98 Teile natürliches Nordseewasser; 1 Teil Schreiberlösung (Koch 1950); 1 Teil Eisencitrat + Citronensäurelösung (0,1% ig).

In Vorversuchen wurden *Chlorella* und *Porphyridium* auf Nähragar kultiviert, wobei aber keine genaue zahlenmäßige Erfassung ihres Zuwachses möglich war. Deshalb wurden für die Hauptversuche Flüssigkeitsdurchlüftungskulturen benutzt, wie sie schon seit langem für die Massenkulturen in unserem Institut verwendet werden.

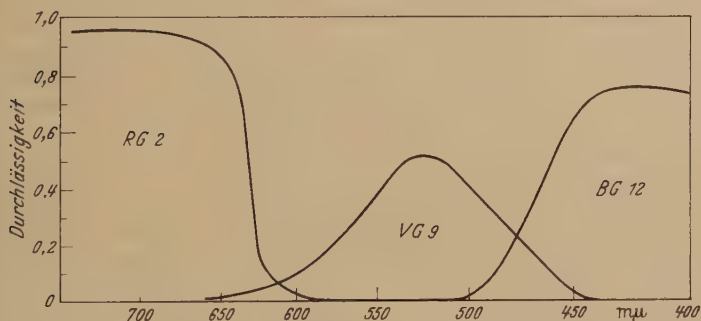


Abb. 1. Durchlässigkeit des roten (RG 2), grünen (VG 2) und blauen (BG 12) Farbfilters

Die Glasröhren waren 18 cm hoch und 4 cm weit und nach unten trichterförmig in ein dünnes Glasrohr ausgezogen. Das Rohr war an einer Stelle düsenförmig verengt, so daß sich mittels einer Kolbenluftpumpe ein sehr regelmäßiger Strom von Luftblasen von unten her durch die Flüssigkeit pressen ließ. Am oberen Ende waren die Röhren durch Zellstoffpfropfen locker verschlossen. Der Strom der Luftperlen riß die Algen immer wieder hoch und verhinderte ihre gegenseitige Verklebung. Das Herausspritzen von Zellen und ihr Anhaften an der Glaswand oberhalb der Flüssigkeit hielt sich in tragbaren Grenzen. Die zugeführte Frischluft wurde in 12 m Höhe aus dem Botanischen Garten entnommen; sie mußte einige Wattefilter passieren und wurde in Waschflaschen mit sterilisiertem aqua dest. angefeuchtet; sie erhielt keinen Zusatz von CO₂. Alle Versuchsgefäße wurden vor Ingebrauchnahme sterilisiert.

Die Durchlüftungsröhren standen zu je 4 dicht nebeneinander an festgelegten Stellen in lichtdichten von regulierbarem Kühlwasser durchflossenen Zinkkästen. Die Temperatur in den Durchlüftungsröhren betrug $19 \pm 1^\circ \text{C}$. Die Kästen, im ganzen 4, standen kreisförmig um eine Osram-Glühbirne (je nach Versuch 300 oder 1000 Watt), die in einem ständig von Kühlwasser durchflossenen Präparatenglas hing. Die Vorderseite der Zinkkästen war zur Erzeugung des farbigen Lichtes durch ein 24×24 cm großes Filter aus farbigem Schottischen Glas (Jena) ersetzt. Für rotes Licht wurde RG 2, für grünes VG 9 und für blaues BG 12 verwendet; alle Scheiben waren 2 mm dick. Der vierte Kasten war zur Weißlichtkontrolle mit farblosem Glas versehen. Die spektrale Lichtverteilung ist aus Abb. 1 zu ersehen,

¹ Nach Koch (1950) und eigenen Versuchen werden durch die geringen Temperaturschwankungen keine ins Gewicht fallenden Änderungen in der Vermehrung der Algen bedingt, zumal sie nicht in langen Perioden wiederkehrten.

die aus Liste 4777 der Jenaer Farb- und Filtergläser entnommen ist. Es findet also nur eine sehr geringe Überschneidung der Spektralbereiche statt.

Die Versuche wurden in energiegelichem Licht gemacht. Die Lichtintensität wurde mit einer Mollschen Thermosäule (Kipp, Delft) in Verbindung mit einem Drehspullichtmarkengalvanometer (F. Bergmann, Hamburg) gemessen. Zum Abfangen der Wärmestrahlen diente ein Schott-Filter BG 17 von 3 mm Stärke¹. Um im Versuch Energiegleichheit in den verschiedenen Lichtfarben herbeizuführen wurde der Abstand der Kästen von der Lampe entsprechend variiert². Der Blauanteil der Osram-Lampen ist sehr gering; deshalb mußten die Kästen mit dem Blaufilter relativ nahe an die Lampe geschoben werden. Hohe Lichtintensitäten ließen sich im Blau überhaupt nicht erzielen, so daß bei den Versuchen mit starkem Licht (Intensitäten 3 und 4) auf das blaue Licht verzichtet werden mußte.

Durchführung der Versuche. Nach Vorversuchen erwies sich eine Einimpfmenge von 120 Zellen je cm³ (Bestimmung mit einer Zählkammer nach Thoma-Zeiss³) als günstig. Diese Zahl ließ sich allerdings nicht absolut innehalten, sondern sie schwankte bei den verschiedenen Versuchsreihen zwischen 119 und 125, in einem bestimmten Fall war sie sogar 131; in den zu einer Vergleichsserie gehörenden Röhren war sie aber konstant.

Die Versuchsdauer betrug im allgemeinen 2—3 Wochen; bei längeren Zeiten traten Unregelmäßigkeiten durch zu große Dichte der Suspension, Erschöpfung der Nährlösung, hemmende Stoffwechselprodukte usw. ein. Zur Zuwachsbestimmung wurde täglich oder jeden zweiten Tag eine bestimmte kleine Menge Flüssigkeit mit einer sterilen Pipette entnommen und ihre Zellenzahl je Kubikmillimeter ausgezählt. Die Entnahme fand stets zur gleichen Tageszeit statt, um keine Umrechnungen für den 24 Std.-Wert vornehmen zu müssen; vor allem aber, um eine Beeinflussung des Ergebnisses durch Teilungsrhythmen der Algen zu vermeiden (vgl. u. a. GEITLER 1944, v. DENFFER 1949, PIRSON u. DÖRING 1952, TAMIYA u. Mitarb. 1953, TAMIYA 1957). Alle Zählungen wurden zwanzigfach wiederholt; außerdem wurde jeder Versuch doppelt angesetzt, und aus dem Ganzen wurde der Mittelwert gebildet⁴.

¹ Um zu prüfen, ob das BG 17-Filter die Wärmestrahlen genügend absorbiert, wurden die Galvanometerausschläge hinter dem Blau- und hinter dem Rotfilter je für sich gemessen; das BG 17-Glas war dabei vor die Thermosäule geschaltet. Bei einer bestimmten Lampenstellung betrugen die Ausschläge 13 bzw. 120 Skalenteile (1 Skt. = $0,374 \cdot 10^{-6}$ Å). Als beide Farbfilter voreinander geschoben wurden (Dunkelheit) ergab sich noch ein Ausschlag von 0,5 Skt., nach Wegnahme des Wärmefilters von 15 Skt. Die Menge der vom BG 17-Glas durchgelassenen Wärmestrahlen ist also äußerst gering; die Wachstumsausschläge der Algen in den verschiedenen Spektralbereichen waren so außerordentlich viel größer, daß die kleine Meßgenauigkeit für den Ausfall der Versuche bedeutungslos ist. Alle Energiemessungen wurden nachts gemacht (geringere Schwankungen des Netzstromes).

² Um auch Lux-Werte für die Galvanometerausschläge angeben zu können, wurden mit einer Selen-Photozelle (Dr. Lange, Berlin) Vergleichsmessungen in weißem Licht gemacht. Sie ergaben für die Lichtintensität der 4 Versuchsreihen (Intensität 1—4) 13 Skt. = 380 Lux, 26 Skt. = 770 Lux, 52 Skt. = 1500 Lux und 78 Skt. = 2250 Lux.

³ Abgestorbene Zellen wurden nicht mitgezählt.

⁴ Der mittlere Fehler war gering. In einem bestimmten Versuch waren die Werte im weißen, roten, grünen und blauen Licht für *Chlorella* $323,9 \pm 1,25$; $349,9 \pm 1,61$; $102,1 \pm 1,94$; $301,1 \pm 1,92$; und in einem anderen Versuch für *Porphyridium* $207,0 \pm 1,68$; $4,6 \pm 0,21$; $289,0 \pm 4,45$; $20,0 \pm 1,18$. Ähnlich gering war er bei allen Versuchen. Wir haben deshalb darauf verzichtet, ihn in den Tabellen usw. anzugeben.

Bei *Chlorella* lagen die Zuwachszahlen im weißen, roten und blauen Licht meist dicht bei einander, so daß Überschneidungen des dreifachen mittleren Fehlers des Mittelwertes bei diesen Farben vorkamen, mit dem Grünlichtwert — und das ist ausschlaggebend — aber niemals. Bei *Porphyridium* traten wohl Überschneidungen der Blau- und Rotlichtwerte ein, nicht hingegen zwischen denen im grünen und weißen Licht, und die Gruppe der Blau- und Rotlichtwerte lag auch wieder deutlich isoliert, so daß auch hier eine einwandfreie Beurteilung möglich war.

II. Ergebnisse

A. Vorversuch

In einem Vorversuch wurden die Algen (*Chlorella* und *Porphyridium*) nicht in durchlüfteten Flüssigkeitsröhren, sondern in Reagensgläsern auf Agar kultiviert. Der Zuwachs wurde durch Abschätzen der Koloniegröße bestimmt und mit den Zahlen 0 (kein Wachstum) bis 6 (gutes Wachstum) festgehalten. Der Versuch wurde mit 4 Parallelen durchgeführt, aus denen der Mittelwert gebildet wurde. Der mittlere Zuwachs im roten, grünen und blauen Licht war für die Grünalge 6,0, 0,5 und 2,5, für die Rotalge 0,5, 4,5 und 1,0. Schon bei diesem methodisch sehr wenig befriedigenden Vorversuch zeigte sich also, daß die Algen am besten in dem zu ihrer Eigenfarbe komplementären Licht wuchsen. *Chlorella* gedieh aber auch im blauen Licht relativ gut, während *Porphyridium* sich im Blau ähnlich schlecht wie im Rot entwickelte.

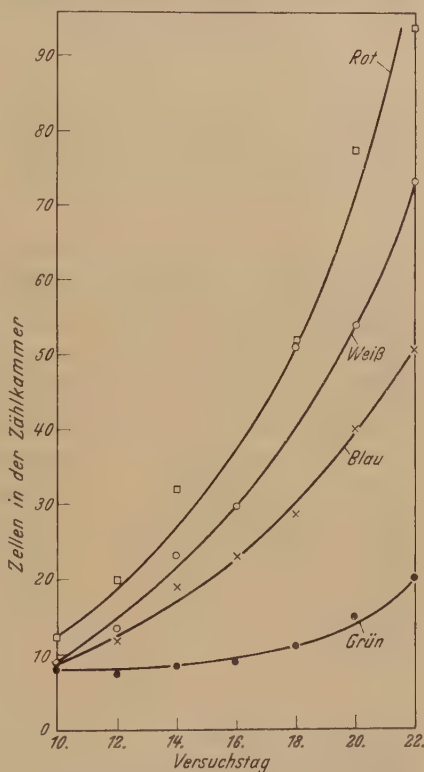


Abb. 2. *Chlorella*. Vermehrung im weißen, roten, grünen und blauen Licht von 380 Lux. Eingepflegt 123 Zellen im mm³ (7,88 Zellen in der Zählkammer)

B. Hauptversuche

1. *Chlorella pyrenoidosa*

a) 380 Lux (Lichtintensität 1)

Die Entwicklung der Algen (Vers. 13) war zunächst sehr schwach, erst vom 10. Versuchstag an waren deutliche Unterschiede in der Zellenzahl in den verschiedenen Spektralbereichen zu erkennen. Die Zuwachskurven wichen im Laufe des Versuchs immer deutlicher auseinander (Abb. 2),

und am 22. Versuchstag (Versuchsende) waren im roten Licht 94,4 Zellen in der Zählkammer vorhanden, im grünen Licht nur 20,1 (bei Versuchsbeginn waren es $7,9 = 124$ Zellen im Kubikmillimeter). Die Entwicklung im roten Licht war also fast fünfmal besser als im grünen. Die Werte im weißen und blauen Licht lagen dazwischen. Ein anderer Versuch unter gleichen Bedingungen (Nr. 7) führte zum gleichen Ergebnis.

b) 770 Lux (Lichtintensität 2)

Bei Verdoppelung der Lichtintensität ging die Entwicklung natürlich rascher. Die etwa gleiche Zellenzahl, die in dem schwächeren Licht erst am 22. Versuchstag erreicht wurde, war jetzt schon am 10. Versuchstag vor-

Tabelle 1. *Chlorella pyrenoidosa*. Zellenzahl in der Zählkammer am 16. Versuchstag. Einimpfmenge bei Versuch 3 122, bei Versuch 9 120 Zellen je Kubikmillimeter (= 7,82 bzw. 7,69 Zellen je Zählkammer); Mittelwerte aus den beiden Versuchen.

Versuch 3 vom 20. 1. bis 7. 2. 1956,
Versuch 9 vom 5. 9. bis 21. 9. 1956, 770 Lux

Lichtfarbe	Zellenzahl in der Zählkammer	xfacher Ertrag
weiß	339,0	43
rot	359,1	46
grün	106,6	14
blau	320,1	41

handen, und als der Versuch am 16. Tag abgebrochen wurde, war die Zellenzahl noch weiterhin auf mehr als das Dreifache gestiegen. Es wurden 2 Versuche gemacht (Nr. 3 und Nr. 9), die zu gut übereinstimmenden Ergebnissen führten; die aus ihnen gezogenen Mittelwerte am Versuchsende enthält Tab. 1.

c) 1500 Lux (Lichtintensität 3)

Wie in der Methodik bereits gesagt worden ist, konnten bei dieser Lichtintensität keine Untersuchungen im blauem Licht mehr

gemacht werden. Es wurden 2 Versuche durchgeführt (Vers. 11 und 15; die Einimpfmenge betrug bei beiden Versuchen 122 Zellen je Kubikmillimeter = 7,82 Zellen je Zählkammer); ihre Werte stimmten gut überein¹, so daß sie zu einem Mittelwert vereinigt werden konnten (Abb. 3). Die Entwicklung war jetzt natürlich noch rascher und die günstigere Wirkung des roten Lichtes zeigte sich nun noch deutlicher. Im grünen Licht vermehrten sich die Zellen innerhalb von 12 Tagen nur auf das Zehnfache, im roten jedoch auf das Hundertdreißigfache. Immerhin, gänzlich ausgeblieben war die Entwicklung der *Chlorella* auch im grünen Licht nicht.

Ergebnis. Die Grünalge *Chlorella* vermehrt sich im roten Licht also sehr viel besser als im grünen.

¹ Zum Beispiel am 6. Versuchstag im Weißlicht 165,0 bzw. 169,2 Zellen, im Grünlicht 20,9 bzw. 24,5, im Rotlicht 214,4 bzw. 213,5, und am 12. Versuchstag entsprechend 763,7 bzw. 778,1, 77,9 bzw. 80,2 und 1018,5 bzw. 1024,0.

2. *Porphyridium cruentum*

a) 380 Lux (Lichtintensität 1)

In den beiden in dieser schwachen Lichtintensität angesetzten Versuchen (Nr. 8 und 14) fand im roten und blauen Licht keine Zellvermehrung statt; im Gegenteil, die Zellenzahl ging im Laufe des Versuchs etwas zurück [im Rot war sie in Vers. 14 am 22. Versuchstag von 7,88 Zellen je Zählkammer (= 123 Zellen im Kubikmillimeter) bei Beginn des

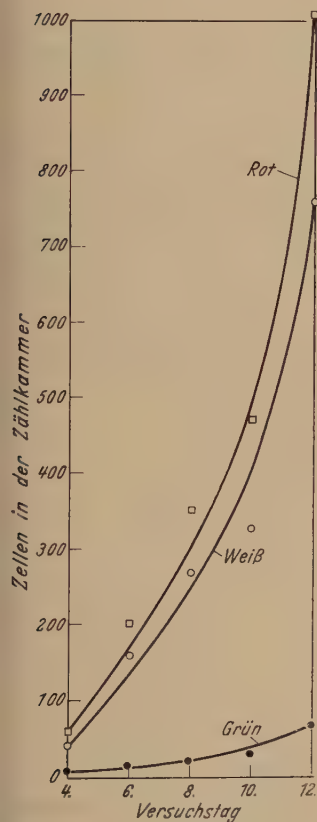


Abb. 3. *Chlorella*. Vermehrung im weißen, roten und grünen Licht von 1500 Lux. Eingepfht 122 Zellen in mm^3 (7,82 Zellen in der Zählkammer)

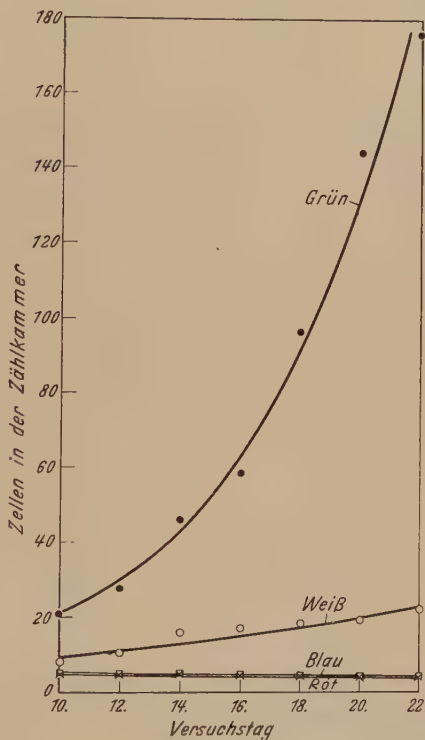


Abb. 4. *Porphyridium*. Vermehrung im weißen, roten, grünen und blauen Licht von 770 Lux. Eingepfht 123 Zellen in mm^3 (7,88 Zellen in der Zählkammer)

Versuchs auf 3,7 gesunken, im Blau auf 4,0]. An sämtlichen Zähltagen war die Zellenzahl je Kammer im blauen Licht um eine bis wenige Stellen hinter dem Komma höher als im roten, so daß also das blaue Licht nicht ganz so ungünstig wirkte wie das rote. Aber auch im Weiß war der Zuwachs nur sehr gering (Abb. 4); er stieg in 22 Tagen auf weniger als das Dreifache der eingepfhten Algenmenge an. Im grünen Licht hingegen

war die Vermehrung außerordentlich groß und erbrachte das 23fache des Ausgangswertes. Beim 2. Versuch (Nr. 8), der nur bis zum 18. Versuchstag durchgeführt wurde, betrug die jetzt herrschende Zellenzahl im weißen : roten : grünen : blauen Licht 15,4 : 5,8 : 90,5 : 5,1 (in Versuch 14 am 18. Versuchstag 19,4 : 4,2 : 97,5 : 4,2).

b) 770 Lux (Lichtintensität 2)

Es wurden 3 Versuche (Nr. 2, 4 und 14) mit im wesentlichen gleichen Ergebnissen gemacht (Tab. 2). Im roten Licht fand wieder keine Vermehrung der Zellen, sondern eine geringfügige Abnahme statt; in den

Tabelle 2. *Porphyridium cruentum*. Lichtintensität 2 (770 Lux). In 18 Tagen in drei Versuchen (2, 4 und 14) erreichte Zellvermehrung (Zellenzahl der Zählkammer)

Versuch 2 vom 23. 11. 1955 bis 11. 12. 1955, Einimpfmenge 119 Zellen im Kubikmillimeter (= 7,63 Zellen in der Zählkammer); Versuch 4 vom 20. 1. 1956 bis 7. 2. 1956, Einimpfmenge 122 Zellen (= 7,82 Zellen in der Zählkammer); Versuch 14 vom 5. 9. 1956 bis 23. 9. 1956, Einimpfmenge 119 Zellen (= 7,63 Zellen in der Zählkammer)

Vers. Nr.	Lichtfarbe	Zellenzahl		xfacher Ertrag	
2	weiß	260,9	} 265,7	34,4	} 34,8
4		255,9		33,4	
14		277,3		36,4	
2	rot	5,5 ¹	} 4,9	0,72	} 0,64
4		4,4		0,58	
14		4,7		0,62	
2	grün	519,3	} 512,9	68,0	} 67,3
4		505,9		66,5	
14		513,4		67,4	
2	blau	22,6	} 23,4	3,0	} 3,1
4		26,0		3,4	
14		21,5		2,8	

¹ Am 14. Versuchstag; am 18. Tag dürfte die Zahl kleiner gewesen sein.

18 Versuchstagen kam es im Grün zu einer Steigerung der Zellenzahl auf das Siebenundsechzigfache des Einimpfwertes. Auch im blauen Licht gab es jetzt eine wenn auch nur schwache Vermehrung, die während der ganzen Versuchsdauer stetig anstieg (in 18 Tagen Verdreifachung). Während 380 Lux (Lichtintensität 1) des blauen Spektralbereichs noch nicht ausreichend waren, um *Porphyridium* zum Wachsen zu bringen, war das bei der doppelten Intensität also der Fall (Überschreitung des Kompensationspunktes oder dergleichen?). Unerwartet war die relativ starke Entwicklung im weißen Licht. Bei Intensität 1 kam es in 22 Tagen nur zu einer Steigerung auf das Dreifache und in 18 Tagen auf das Zweifache; jetzt lag in 18 Tagen eine Vermehrung der Algen auf den 35fachen

Ausgangswert vor. Der absolute wie relative Zuwachs in den verschiedenen Spektralfarben war also bei verschiedenen Lichtintensitäten verschieden groß.

c) 1500 Lux (Lichtintensität 3)

Bei 1500 Lux kam es in beiden Versuchen (Nr. 12 und 16) bei *Porphyridium* nun auch im Rotlicht zu einer Zellvermehrung, und zwar auf das 3,4fache des Ausgangswertes (Tab. 3); auch im roten Licht kann die Rotalge also wachsen, wenn nur die Lichtintensität hinreichend groß ist.

Tabelle 3. *Porphyridium cruentum*. Lichtintensität 3 (1500 Lux). In 14 Tagen in zwei Versuchen (12 und 16) erreichte Zellenzahl je Zählkammer

Versuch 12 vom 19. 10. bis 2. 11. 1956, Einimpfmenge 131 Zellen im Kubikmillimeter (= 8,4 Zellen in der Zählkammer); Versuch 16 vom 6. 12. bis 20. 12. 1956, Einimpfmenge 123 Zellen im Kubikmillimeter (= 7,88 Zellen in der Zählkammer)

Vers. Nr.	Licht- farbe	Versuchstag						xfacher Ertrag am 14. Tag
		4	6	8	10	12	14	
12	weiß	35,0	108,4	219,0	326,2	494,4	776,1	92,6
16 ¹		28,8	106,0	200,2	319,8	479,4	746,2	94,8
12	rot	6,0	7,5	10,2	12,7	17,3	31,4	3,7
16 ¹		7,4	8,6	10,0	12,9	15,6	24,5	3,1
12	grün	62,8	204,3	326,1	488,5	736,8	842,2	100,8
16 ¹		62,2	204,9	318,9	467,8	694,3	812,8	102,9

¹ Die im allgemeinen etwas geringere absolute Zellenzahl in Versuch 16 könnte zum Teil auf der etwas kleineren Einimpfmenge beruhen.

Der Zuwachs im grünen Licht blieb auch in dieser Lichtintensität am stärksten; aber die Entwicklung im weißen Licht erfuhr noch eine weitere Steigerung, so daß sie fast an die im grünen heranreichte.

d) 2250 Lux (Lichtintensität 4)

Leider ließ sich bei dieser Intensität aus technischen Gründen weder blaues noch grünes Licht mehr herstellen, der Versuch mußte also auf weißes und rotes Licht beschränkt werden. In beiden Lichtqualitäten war der Zuwachs weiter gesteigert (Tab. 4). Im roten Licht wurde zwar

Tabelle 4. *Porphyridium cruentum*. Lichtintensität 4 (2250 Lux). Zellenzahl in der Zählkammer

Versuch 6, 12. 3. bis 23. 3. 1956, Einimpfmenge 123 Zellen (= 7,88 Zellen in der Zählkammer)

Lichtfarbe	Versuchstag				xfacher Ertrag am 11. Tag
	8	9	10	11	
weiß	107,2	198,0	436,4	644,3	81,6
rot	14,6	13,9	20,0	26,5	3,4

nur eine Verdreifachung der Zellenzahl beobachtet, aber sie war schon am 11. Versuchstag erreicht (in 1500 Lux war die Zellenzahl am 11. Versuchstag noch nicht einmal verdoppelt), und im weißen Licht war der Ertrag am 11. Tag 82fach (in 1500 Lux am allerdings 10. Tag erst 40,5fach). Der Zuwachs hatte sich in beiden Lichtfarben also noch gesteigert, ohne daß man über Besonderheiten in den Spektralbereichen mit Sicherheit Neues aussagen könnte.

Ergebnis. Für das Wachstum von *Porphyridium cruentum* sind rotes und blaues Licht also wenig wirksam; der beste Zuwachs findet im grünen Licht statt.

3. *Trailliella intricata*

Ergänzend wurden einige Versuche mit der fädigen Rotalge *Trailliella intricata* im grünen, blauen und roten Licht gemacht (770 Lux, Lichtintensität 2). Der zarte, etwas verzweigte Algenfaden hing an einem Glashaken in der Kulturflüssigkeit. Häufiges Herausholen vertrug er nicht, deshalb wurde nur einmal, und zwar nach vier Wochen, der Zuwachs neuer Zellen gezählt. Länger ausgedehnt konnte der Versuch nicht werden, weil die Fäden sich zusammenknäuelten und ihr Zuwachs deshalb nicht mehr sicher ermittelt werden konnte. Der Versuch wurde mit nur zwei Parallelen durchgeführt. Im grünen Licht bildeten sich 33 neue Zellen, im roten 8 und im blauen 14. Zweifellos sind die Messungen mit einem erheblichen Unsicherheitsfaktor behaftet; trotzdem ist auch hier die Überlegenheit des grünen Lichtes eindeutig, wenn auch nicht ganz so stark wie bei *Porphyridium*; auch im blauen Licht war der Zuwachs relativ stark.

Ergebnis. Auch *Trailliella* wächst also im grünen Licht wesentlich besser als im blauen und vor allem im roten.

III. Diskussion

Die vorstehend geschilderten Versuche haben also gezeigt, daß die beiden Rotalgen und die Grünalge am besten in dem zu ihrer Eigenfarbe komplementären Licht wachsen. Der Wirkungsgrad der drei Spektralbereiche scheint dabei von der Lichtintensität und der Versuchsdauer abhängig zu sein. Das wird am deutlichsten, wenn man die Vermehrung im Licht der Eigenfarbe der Alge = 1 setzt¹.

Porphyridium. Im schwächsten Versuchslicht (Intensität 1, 380 Lux) ging die Zellenzahl im roten (und ebenso im blauen) Licht langsam zurück (Tab. 4²), im grünen Licht stieg sie dagegen stark an. Dieser relative Vorsprung der Vermehrung im grünen Licht gegenüber der im roten wurde von Tag zu Tag stärker; am 22. Tag erreichte die Ernte das 49fache der Zellenzahl im roten Licht. — In 770 Lux (Lichtintensität 2) war das noch

¹ Von den nachstehenden Erörterungen muß *Trailliella* ausgenommen werden, weil die bei ihr erhaltenen Werte mit zu großen Unsicherheiten behaftet sind.

² Die Zahlen in den Tab. 4 und 5 sind die Mittelwerte aus allen unter gleichen Bedingungen (Lichtintensität, Lichtfarbe und Versuchszeit) gemachten Einzelversuchen.

Tabelle 4. *Porphyridium*. Mittelwerte aus allen Versuchen. a = Vielfaches der eingimpften Zellen, b = Vielfaches der Ernte im Rot

Farbe		Rotlicht			Grünlicht			Blaulich		
Intensität		1	2	3	1	2	3	1	2	3
4. Tag	a	—	0,75	1	0,82	1	2,93	7,68	9,4	0,93
	b	—	—	—	—	—	—	—	—	1,2
6. Tag	a	—	0,79	1	0,98	1	4,69	25,11	25,6	1,03
	b	—	—	—	—	—	—	—	—	1,3
8. Tag	a	—	0,65	1	1,23	1	6,83	39,56	32,1	0,98
	b	—	—	—	—	—	—	—	—	1,8
10. Tag	a	0,74	0,63	1	1,83 ¹	1	11,80	56,51	32,4	1,19
	b	—	—	—	—	—	3,7	0,82	1,1	1,9
12. Tag	a	0,82	0,70	1	2,02	1	18,92	87,57	40,8	1,58
	b	—	—	—	—	—	3,4	0,90	1,1	2,3
14. Tag	a	0,69	0,66	1	3,38	1	25,83	101,82	30,3	2,16
	b	—	—	—	—	—	7,2	0,70	1,0	3,3
16. Tag	a	0,66	0,60	1	—	—	43,86	0,66	1,0	2,77
	b	—	—	—	—	—	10,0	—	—	4,6
18. Tag	a	0,58	0,75	1	—	—	67,0	0,63	1,1	2,95
	b	—	—	—	—	—	89,3	—	—	3,9
20. Tag	a	0,45	—	—	—	—	—	0,53	1,2	—
	b	—	—	—	—	—	—	—	—	—
22. Tag	a	0,46	—	—	—	—	—	0,50	1,1	—
	b	—	—	—	—	—	—	—	—	—

¹ Bei diesem Versuch wurde auch noch Intensität 4 (= 2250 Lux) im roten Licht angewandt; das Vielfache der Einimpfung betrug dabei 3,12.

viel ausgeprägter; schon in 18 Tagen wurde der fast 90fache Wert desjenigen im roten Licht gezählt. Die relative Zuwachskurve im grünen Licht schwingt sich daher sehr steil empor (Abb. 5). Aber auch im blauen Licht kam *Porphyridium* in 770 Lux zum Wachstum, allerdings in 18 Tagen nur bis zur 3fachen Zahl der eingepfunden Zellen und damit

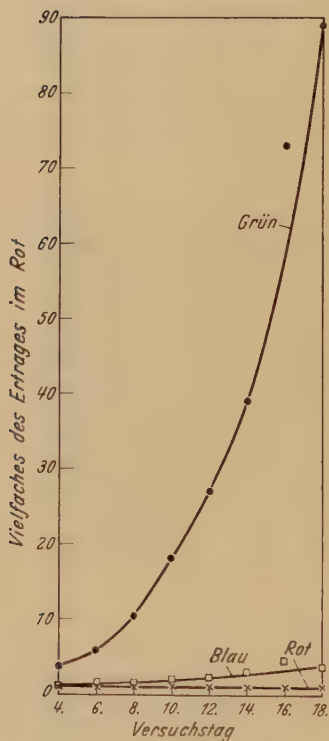


Abb. 5. *Porphyridium*. Vielfaches des Rotlichtertrages im blauen und grünen Licht. 770 Lux

auf das 4fache der im Rot erreichten Zellenzahl. — In 1500 Lux (Intensität 3) schließlich kam auch im roten Licht schwache Vermehrung zustande: in 12 Tagen Verdoppelung der Zahl der eingepfunden Zellen. Im grünen Licht stieg die Zellenzahl in der gleichen Zeit zwar auf das 88fache an, die relative Vermehrung war aber infolge des gleichzeitigen Anstiegs der Zellenzahl im roten Licht nicht so groß wie man erwarten sollte, nämlich nur 41fach. Auf den Rückgang des Relativwertes am 14. Tag kommen wir gleich noch zuzusprechen.

Die günstige Entwicklung von *Porphyridium* in dem zur Eigenfarbe der Alge komplementären Licht gegenüber der im roten nahm also mit Verstärkung der Beleuchtung zu. Ebenso stieg sie mit zunehmender Versuchszeit an (Tab. 4).

Chlorella. Bei der Grünalge (Tab. 5) war die Vermehrung im Licht der Eigenfarbe in allen Lichtintensitäten sehr viel stärker als bei *Porphyridium*. Schon im schwächsten grünen Licht kam es in 22 Tagen zur Verdreifachung der Zahl der eingepfunden Zellen, und in den beiden höheren Lichtintensitäten waren die Werte noch bedeutend höher. Das hat zur Folge,

daß die Überlegenheit des Zuwachses im Komplementärlicht bei *Chlorella* wesentlich geringer war als bei *Porphyridium*; sie ging nicht über das 13fache hinaus (gegenüber dem 90fachen bei *Porphyridium*). Dagegen war im blauen Licht das Wachstum von *Chlorella* ziemlich gut: Zellvermehrung in Intensität 2 in 16 Tagen auf das 41fache der Einsaat (bei *Porphyridium* kam es in Blau hingegen nicht über Verdreifachung der Zellen hinaus); der relative Zuwachs im Blau bezogen auf das Wachstum im Grün war daher nicht sehr stark verschieden von dem im roten Licht. — In großen Zügen ist auch bei *Chlorella* ein Anstieg der absoluten wie relativen Zahlen beim Lesen der Tabelle von oben nach

Tabelle 5. *Chlorella*. Mittelwerte aus allen Versuchen. a = Vielfaches der eingepfiffen Zellen; b = Vielfaches der Ernte im Grün

Farbe	Rotlicht			Grünlicht			Blaulicht		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
4. Tag a	—	1,77	8,15	—	0,93	1,40	—	1,09	—
4. Tag b	—	—	5,8	—	—	—	—	1,2	—
6. Tag a	—	5,65	26,9	—	1,18	2,88	—	4,15	—
6. Tag b	—	4,8	9,3	—	1	1	—	3,5	—
8. Tag a	—	7,79	45,3	—	1,65	4,05	—	6,75	—
8. Tag b	—	4,7	11,2	—	1	1	—	3,8	—
10. Tag a	1,63	13,9	60,7	1,15	3,24	4,94	1,14	10,49	—
10. Tag b	1,4	4,3	12,3	1	1	1	1,0	3,2	—
12. Tag a	2,42	17,49	130,31	1,13	4,70	9,70	1,39	13,56	—
12. Tag b	2,1	3,7	13,4	1	1	1	1,2	2,9	—
14. Tag a	3,64	20,59	131,7	1,27	7,84	19,75	1,94	17,6	—
14. Tag b	2,9	2,6	6,7	1	1	1	1,5	2,2	—
16. Tag a	3,84	46,2	—	1,38	13,7	—	2,83	41,2	—
16. Tag b	2,8	3,4	—	1	1	—	2,1	3,0	—
18. Tag a	5,77	—	—	1,56	—	—	3,18	—	—
18. Tag b	3,7	—	—	1	—	—	2,0	—	—
20. Tag a	9,69	—	—	1,98	—	—	5,09	—	—
20. Tag b	4,9	—	—	1	—	—	2,6	—	—
22. Tag a	11,84	—	—	2,52	—	—	6,42	—	—
22. Tag b	4,7	—	—	1	—	—	2,5	—	—

unten wie auch — innerhalb der einzelnen Lichtfarben — von links nach rechts vorhanden, wenn auch bei der Kleinheit der Werte viel mehr Abweichungen von der Regel vorhanden sind als bei *Porphyridium*. Auch bei *Chlorella* fällt ein Wert (b am 14. Tag im Rot der Intensität 3) völlig aus der Reihe heraus.

Es wäre verkehrt, aus diesen Zahlen den Schluß zu ziehen, daß unter allen Umständen der relative Zuwachs im Licht der Komplementärfarbe ständig zunähme gegenüber dem in der Eigenfarbe. Tatsächlich sind ja auch in den Tab. 4 und 5 2 Fälle vorhanden, in denen der relative Zuwachswert wieder zurückgeht (bei *Porphyridium* der Wert von b am 14. Tag im Grün der Intensität 3 und bei *Chlorella* ebenfalls am 14. Tag und Intensität 3, aber im Rot). Die Erklärung für diese Ausnahmen von der Regel ist einfach.

Bei *Chlorella* (Tab. 5) betrug das Vielfache der eingepfhten Zellenzahl am 12. Versuchstag im Rot 130, am 14. war es auf nur 132 weitergestiegen, d. h. praktisch unverändert geblieben. Da im grünen Licht die Zellenzahl in Intensität 3 vom 12. zum 14. Tag noch stark angestiegen war (von 10 auf 20), so mußte der Relativwert rot;grün natürlich stark zurückgehen, nämlich von 13 auf 7. Ähnlich, wenn auch nicht so extrem, liegen die Verhältnisse vom 12. zum 14. Tag bei *Porphyridium* (Vermehrung der a-Werte im Grün der Intensität 3 von 88 auf nur 102, im Rot hingegen von 2,0 auf 3,4). Offenbar war bei *Chlorella* mit Erreichen des 130fachen der eingepfhten Zellenzahl (≈ 16000 Zellen im Kubikmillimeter) kein wesentlicher weiterer Zuwachs mehr möglich (Erschöpfung der Nährlösung, Anreicherung giftiger Stoffwechselprodukte usw.). Bei *Porphyridium* bahnte sich dieser Zustand bei etwa dem 100fachen der Zellen ebenfalls an. Die sich steil aufschwingenden S-förmigen Zuwachskurven (vgl. z. B. von DENFFER 1949, TAMIYA 1957) bogen nun also in die Horizontale über (Abb. 6, Rotlichtkurve für *Chlorella*). Das Gleiche muß bei allen Lichtintensitäten und -farben schließlich eintreten. In Abb. 6 ist der wahrscheinliche Verlauf der Grünlichtkurve vom 14. Versuchstag ab durch Strichelung ergänzt¹. Unter ungünstigen Bedingungen (schwaches Licht, ungünstige Wellenlänge) sind die Zuwachswerte also relativ niedrig; sie werden unter günstigen Verhältnissen zunehmend größer, um schließlich alle den gleichen Endwert zu erreichen. Die Kurven entfernen sich also anfänglich von einander, nähern sich aber später einander wieder. Da der Zuwachs im Licht der Eigenfarbe anfänglich stets viel geringer war als im Komplementärlight, so muß das Verhältnis Wachstum im Komplementärlight: Wachstum im Licht der Eigenfarbe also zunächst größer, dann aber wieder kleiner werden. Der relative Zuwachsanstieg bei beiden Algen im komplementär gefärbten Licht gegenüber dem in der Eigenfarbe war daher garnicht anders zu erwarten; er muß auch bei Konstanz der Außenfaktoren bei längerer Versuchszeit wieder zurückgehen. Ferner muß er bei größerer Lichtintensität, bei stärkerer Einimpfung oder jeder anderen Maßnahme, die zu einer rascheren Zunahme der Zellenzahl führen würde, auch schon innerhalb der von uns verwendeten Versuchszeit wieder absinken. In zwei Fällen war das ja auch innerhalb unserer Versuchszeit bereits der Fall.

¹ Ob die Kurve bei wirklicher Durchführung des Versuchs über den 14. Tag hinaus genau so verlaufen wäre, ist für unsere Betrachtungen ohne Bedeutung; wahrscheinlich wäre ihr Anstieg weniger steil gewesen.

Das gegensätzliche Verhalten der Grün- und Rotalgen kommt gut zum Ausdruck, wenn irgend welche unter gleichen Bedingungen entstandenen Werte, z. B. die Ernte am 12. Versuchstag in Lichtintensität 2 in den verschiedenen Lichtfarben, in ein Koordinatensystem eingetragen werden (Abb. 7). Der geringe Zuwachs von *Chlorella* im grünen und der hierstarke von *Porphyridium* springen dabei sehr ins Auge. Immerhin zeigte *Chlorella* auch im Licht der Eigenfarbe (grün) noch eine relativ starke Zellvermehrung, während *Porphyridium* im Rot überhaupt keinen und im Blau nur äußerst schwachen Zuwachs aufwies.

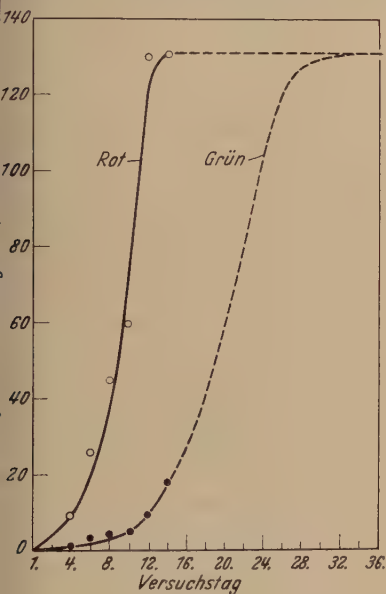


Abb. 6. *Chlorella*, Ertrag (Vielfaches der eingepf. Zellen) im roten und grünen Licht der Intensität 3. Ausgezogen: gemessene Werte bis zum 14. Versuchstag; gestrichelt: geschätzte Werte für weitere Versuchsdauer

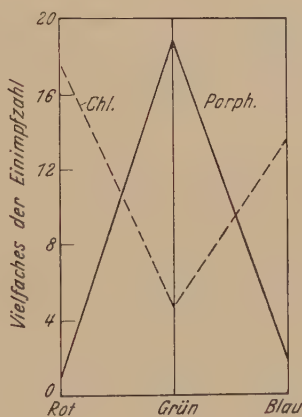


Abb. 7. Ertrag von *Porphyridium* und *Chlorella* im roten, grünen und blauen Licht der Intensität 2 (770 Lux) am 12. Versuchstag. Zellenzahl bei der Einimpfung = 1 gesetzt

Ob dabei eine Adaptation des Assimilationsapparats der Pflanzen in dem Sinne stattgefunden hat, daß bei längerer Kultur in farbigem Licht eine bessere Ausnutzung derjenigen Wellenlängen stattfindet, in denen die Pflanzen gewachsen sind, wie HARDER, DÖRING u. SIMONIS (1936) es bei *Helodea* beobachtet haben, wurde nicht untersucht. Sie würde natürlich die bessere Ausnutzung des zur Eigenfarbe komplementären Lichtes etwas herabgesetzt haben.

In Abb. 8 und 9 ist die Ernte (Vielfaches der eingepf. Zellenzahl) am 14. Versuchstag im roten, grünen und blauen Licht abgetragen und zwar in den 3 Lichtintensitäten übereinander. Blaues Licht konnte allerdings — wie schon gesagt — nur in den Intensitäten 1 und 2 hergestellt werden, für die „Säule“ im Blau fehlt also die stärkste Lichtintensität. Vergleicht man die zur gleichen Intensität gehörenden „Erntehöhenlinien“, so findet man die ja auch schon aus allen vorstehenden Er-

örterungen hervorgegangene Tatsache, daß bei *Chlorella* die Ernte in Intensität 2 im Rot nicht wesentlich größer war als im Blau und in jeder dieser Farben sehr viel höher als im Grün (Abb. 8). Die Breite der

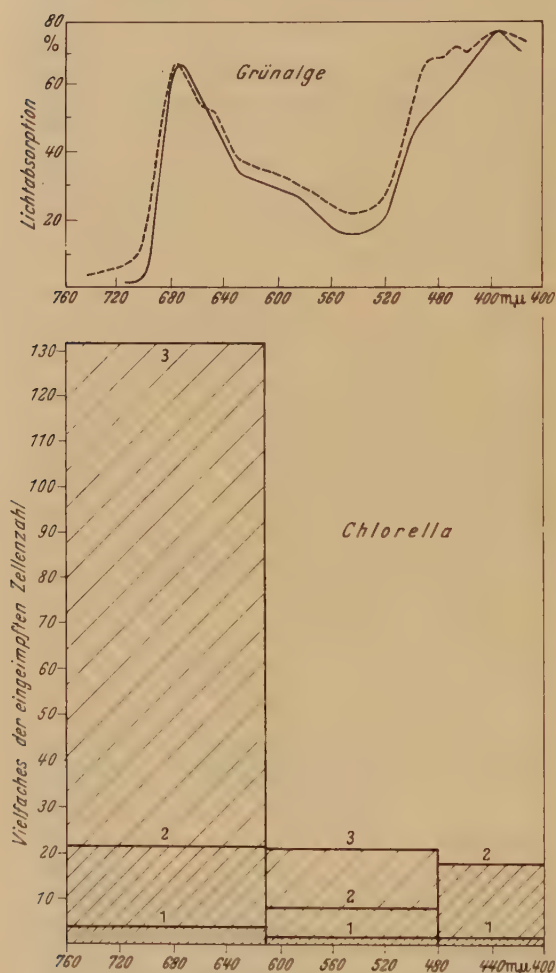


Abb. 8. *Chlorella*. Ertrag (Vielfaches der eingepfropften Zellenzahl) am 14. Versuchstag im roten, grünen und blauen Licht in den Lichtintensitäten 1, 2 und 3 (Intensität 3 ohne Blau). Darüber die Absorptionskurve (gestrichelt) und die photosynthetische Wirkungskurve (ausgezogen) von *Ulva taenia* nach HAXO u. BLINKS

Säulen entspricht dem Durchlaßbereich unserer Schottschen Farbgeläser; die zugehörigen Wellenlängen sind auch im oberen Teil des Koordinatensystems eingetragen, und darüber sind 2 Kurven gezeichnet, die HAXO u. BLINKS (1950) entnommen sind; sie geben die Absorptionskurve (gestrichelt) und die Kurve des photosynthetischen Wirkungsspektrums (ausgezogen) von *Ulva taenia* wieder. Der starken Wirksamkeit im Rot und im Blau entspricht ein guter Zuwachs der Alge. Die Zellvermehrung von *Chlorella* deckt sich also in großen Zügen — mehr läßt sich nicht sagen — mit den an die photosynthetische Wirkungskurve zu knüpfenden Erwartungen.

Anders bei *Porphyridium*. Nach HAXO u. BLINKS decken sich bei der Rotalge *Porphyra nereocystis* die Absorptionskurve des Thallus und die der relativen

Assimilationsleistung nicht mit einander (Abb. 9). Auf die dafür gegebenen theoretischen Deutungen braucht hier nicht eingegangen zu werden (vgl. FRENCH u. YOUNG 1952, BLINKS 1954, YOCUM u. BLINKS 1954, PIRSON 1953, 1955, ROSENBERG 1957). Aus dem Verlauf der HAXO-

und BLINKSSchen Wirkungskurve im Bereich unseres Grünfilters (Abb. 9) ist ohne weiteres verständlich, weshalb *Porphyridium* in diesem Gebiet die stärkste Vermehrung zeigte. Nicht direkt verständlich ist aber, daß der Zuwachs im blauen und roten Licht so außerordentlich gering war. Die Zellvermehrung war noch weit niedriger, als man aus der geringen Leistung des Chlorophylls, wie sie in der niedrigen photosynthetischen Wirkungskurve zum Ausdruck kommt, voraussagen konnte.

Wenn man die zwischen der Abszisse und der HAXO- u. BLINKSschen Leistungskurve liegende Fläche ausmißt, so erhält man für den roten, grünen und blauen Bezirk der Wellenlänge unserer Filter die relativen Werte 287:799:134¹. Zweifellos ist der Versuch, auf diese Weise zu einem Bild der zu erwartenden Wirksamkeit zu gelangen, sehr grob; u. a. schon deshalb, weil die von HAXO u. BLINKS in sehr engen Wellenbezirken erhaltenen Werte nicht näher zu unseren sehr breiten, von den Glasfiltern durchgelassenen Spektralbereichen (die sich zudem, wenn auch nur wenig — siehe Abb. 1 — über schneiden) in Beziehung gesetzt werden können. Ein gewisser Anhaltspunkt ist dadurch aber doch gegeben.

Nach der HAXO- und BLINKSSchen Wirkungskurve sollte man im Blau wie vor allem im Rot höhere Vermehrungswerte des *Porphyridiums* erwarten. Ob dafür Verschiebungen in der Quantität der Plastidenfarbstoffe,

wie sie KOCH (1953) bei verschiedener Lichtintensität für *Porphyridium* nachgewiesen hat, besondere Energieübertragungsverhältnisse bei aktiven und inaktiven Stadien der Assimilationspigmente (FRENCH u. YOUNG

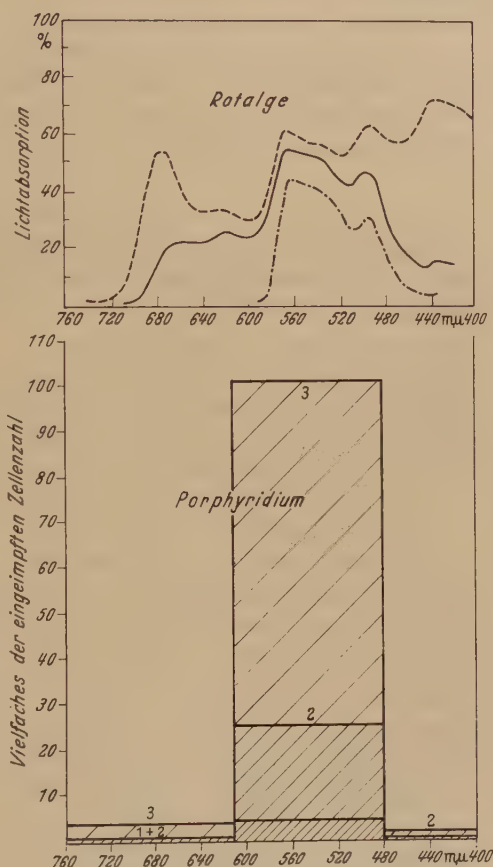


Abb. 9. Wie Abb. 7, jedoch für *Porphyridium*. Absorptions- und Wirkungskurve von *Porphyra nereocystis*; die dritte Kurve gibt die Absorption des Phycocrythrins wieder

¹ Für die Grünalge sind die entsprechenden Werte 837:754:864.

1952, BLINKS 1954, YOCUM u. BLINKS 1954, DUYSSENS 1952), etwaige Unterschiede in der chemischen Natur der Pigmente bei *Porphyra* und *Porphyridium* (vgl. BLINKS 1954, YOCUM u. BLINKS 1954, HAXO, O'H EOGHA u. NORIS 1955)¹ oder Einflüsse der Lichtintensitäten eine Rolle spielen, oder was sonst die Ursache sein mag, kann erst durch weitere Versuche geklärt werden².

Unsere Versuche haben also gezeigt, daß man nicht ohne weiteres von Photosynthesergebnissen auf alle Einzelheiten des Algenwachstum im farbigen Licht schließen kann, daß aber trotzdem die Engelmannsche Theorie über die Tiefenverteilung der roten und grünen Meeresalgen im Prinzip richtig ist.

Zusammenfassung

1. Die beiden einzelligen Algen *Chlorella pyrenoidosa* (Chlorophyceae) und *Porphyridium cruentum* (Bangioideae) wurden während einiger Wochen in Durchlüftungsröhren in energiegleichem roten, grünen, blauen und weißen Licht kultiviert.

2. Beide Algen entwickelten sich wenig oder gar nicht im Licht ihrer Eigenfarbe, gut im komplementär gefärbten Licht.

Wenige Messungen an der fadenförmigen Floridee *Trilliella intricata* führten zum gleichen Ergebnis.

Die gegensätzliche Reaktion im roten und grünen Licht war bei *Porphyridium* noch stärker ausgeprägt als bei *Chlorella*.

3. Das Verhältnis der Zellvermehrung im roten und grünen Licht war innerhalb der Versuchszeit nicht konstant: Mit zunehmender Lichtintensität (von 380—1500 Lux) wurde bei *Porphyridium* der relative Vorsprung des Zuwachses im grünen Licht immer größer, und die gleiche

¹ Erst nach Abschluß des Manuskriptes haben wir die schwer erhältliche Proefschrift von L. N. M. DUYSSENS „Transfer of Excitation Energy in Photosynthesis“ (Utrecht 1952) einsehen können. Der Verfasser war so freundlich, uns einen Sonderdruck davon zu überlassen. Darin sind Kurven mit dem Absorptionsspektrum und den photosynthetischen Wirkungsspektrum unseres Objektes, also *Porphyridium cruentum*, enthalten. Das Absorptionsspektrum für die Photosynthese verläuft etwas anders als bei *Porphyra*, jedoch sind die Unterschiede nicht so groß, daß sich dadurch unsere Wachstumswerte in den drei Farbbereichen verstehen ließen.

² Ebenfalls erst nach Abschluß des Manuskriptes haben wir in einem Referat in den Berichten über die Wissenschaftliche Biologie vom Februar 1957 (109, 38) über eine Arbeit von L. R. BLINKS (Photosynthesis and productivity of littoral marine Algae; J. Marine Res., 14, 363, 1955) den Satz gefunden: „Nach kurzen Betrachtungen über die Bedeutung der Pigmente für die Lichtausnutzung am Standort wurden von mehreren Rotalgen, Grünalgen und Braunalgen Werte für die Algenproduktion in verschiedenen Zeitabschnitten zusammengestellt.“ Leider ist es uns bisher nicht gelungen, uns das Journal of Marine Research zu beschaffen. Wir können daher auch nichts darüber aussagen, ob die BLINKSsche „Zusammenstellung“ zu gleichen Ergebnissen geführt hat wie unsere Kulturversuche.

Verschiebung, wenn auch weniger stark, trat auch mit zunehmender Versuchszeit ein. In einem bestimmten Versuch war die Zellvermehrung im grünen Licht am 12. Versuchstag bei 380 Lux 3mal, bei 770 Lux 27mal und bei 1500 Lux 41mal stärker als im roten Licht, und mit der Versuchsdauer stieg sie vom 4fachen Wert am 4. Tag nach der Impfung auf den 89fachen am 18. Tag. Bei *Chlorella* war es ähnlich mit dem Vorsprung im roten Licht, jedoch waren die Verhältnisse hier weniger deutlich.

Es wird erörtert, daß es sich dabei nur um eine unter bestimmten Bedingungen zu beobachtende Erscheinung handelt, die sich aus den allgemeinen Gesetzmäßigkeiten bei der Vermehrung unter künstlichen Verhältnissen ergibt.

4. Die Entwicklung der Algen im roten, grünen und blauen Licht entsprach nicht der Absorptionskurve der Algen; sie deckte sich aber auch nicht genau mit den von HAXO u. BLINKS sowie DUYSSENS aufgestellten photosynthetischen Wirkungskurven. Das gilt in besonders extremer Weise für *Porphyridium*.

5. Man kann daher aus Assimilationsversuchen keine sicheren Rückschlüsse auf die Gültigkeit der Engelmansschen Theorie über die Verteilung farbiger Algen in verschiedenen Meerestiefen ziehen. Die Wachstumsversuche haben aber gezeigt, daß die Theorie richtig ist.

Literatur

BAATZ, I.: Die Bedeutung der Lichtqualität für Wachstum und Stoffproduktion planktonischer Meeresdiatomeen. *Planta* **31**, 726 (1940/41). — BLINKS, L. R.: The photosynthetic function of pigments other than chlorophyll. *Ann. Rev. Plant Phys.* **5**, 93 (1954).

DENFFER, D., v.: Über einen Wachstumshemmstoff in alternden Diatomeenkulturen. *Biol. Zentralbl.* **67**, 7 (1948). — Die planktische Massenkultur pennater Grunddiatomeen. *Arch. f. Mikrob.* **14**, 159 (1949). — DUYSSENS, L. N. M.: Transfer of excitation energy in photosynthesis. Proefschrift, Utrecht 1952.

EHRKE, G.: Über die Assimilation komplementär gefärbter Meeresalgen im Lichte von verschiedener Wellenlänge. *Planta* **17**, 650 (1932).

FRENCH, C. S., and V. K. YOUNG: The influence spectra of red algae and the transfer of energy from phycoerythrins to phycocyan and chlorophyll. *J. Gen. Physiol.* **35**, 873 (1952).

GEITLER, L.: Furchungsteilung, simultane Mehrfachteilung, Plasmolyse und Ökologie der Bangiacee *Porphyridium cruentum*. *Flora (Jena)* **137**, 300 (1944).

HARDER, R.: Über die Bedeutung von Lichtintensität und Wellenlänge für die Assimilation grüner Algen. *Z. Bot.* **15**, 305 (1923). — HARDER, R., B. DÖRING u. W. SIMONIS: Über die Kohlensäureassimilation in verschiedenen Spektralbezirken durch grüne, in farbigem Licht kultivierte Pflanzen. *Nachrichten Gesellsch. d. Wissensch. Göttingen, Math.-phys. Kl. N. F. Fachgr. VI*, **2**, 7, 129 (1936). — HAXO, F. T., and L. R. BLINKS: Photosynthetic action spectra of marine Algae. *J. Gen. Physiol.* **33**, 389 (1950). — HAXO, F., C. O'H EOGHA and P. NORRIS: Com-

parative studies of chromatographically separated phycoerythrins and phyco-cyanins. Arch. of Biochem. a. Biophysics **54**, 162 (1955).

KOCH, W.: Entwicklungsgeschichtliche und physiologische Untersuchungen an Laboratoriumskulturen der Rotalge *Trilliella intricata* Batters (Bonnemaisoniaceae). Arch. Mikrobiol. **14**, 635 (1950). — Untersuchungen an bakterienfreien Massenkulturen der einzelligen Rotalge *Porphyridium cruentum*. Arch. Mikrobiol. **18**, 232 (1953).

MONTFORT, C.: Farbe und Stoffgewinn im Meer. Untersuchungen zur Theorie der komplementären Farbenanpassung nordischer Meeresalgen. Jb. Bot. **79**, 493 (1934). — Carotinoide, Photosynthese und Quantentheorie. Jb. Bot. **83**, 725 (1936).

PIRSON, A.: Stoffwechsel organischer Verbindungen: I. Fortschr. Bot. **14**, 289 (1953); **17**, 529 (1955). — PIRSON, A., u. H. DÖRING: Induzierte Wachstumsperioden bei Grünalgen. Flora (Jena) **139**, 314 (1952).

ROSENBERG, J. L.: Photochemistry of Chlorophyll. Annal Rev. Plant. Physiol. **8**, 115 (1957).

SCHMIDT, G.: Die Wirkung der Lichtqualität auf den Assimilationsapparat verschieden gefärbter Gewebe. Ein Beitrag zur Fucoxanthintheorie. Jb. Bot. **85**, 554 (1937). — SEYBOLD, A.: Über die Lichtenergiebilanz submerser Wasserpflanzen, vornehmlich der Meeresalgen. Jb. Bot. **79**, 591 (1934).

TAMIYA, H.: Mass Culture of Algae. Ann. Rev. Plant Physiol. **8**, 309 (1957). — TAMIYA, H., K. SHIBATA, T. SASA, T. IWAMURA and J. MORIMURA: Effect of diurnal intermittent illumination on the growth and some cellular characteristics of *Chlorella*. In: BURLEW, I. S., Algal culture. Carnegie Institution of Washington Publication **600**, 76 (1953).

VINCE, D.: Studies on the effects of light intensity and quality on the growth and development of plants II. Formative effects in *Lycopersicon esculentum* and *Pisum sativum*. Journ. of Horticultural Science **31**, 16 (1956).

WASSINK, E. C., and J. A. J. STOLWIJK: Effects of light quality on plant growth. Ann. Rev. Plant Physiol. **7**, 373 (1956).

YOCUM, C. S., and L. R. BLINKS: Photosynthetic efficiency of marine plants. Journ. Gen. Physiol. **38**, 1 (1954).

(Aus dem Pharmakognostischen Institut der Universität Bonn)

Harnstoffassimilation mit und ohne Ureasewirkung bei Mikroorganismen

(*Endomycopsis vernalis*, *Torulopsis utilis*, *Willia anomala*)*

Von

MAXIMILIAN STEINER und HORST KATING

(Eingegangen am 18. Juli 1957)

Das Vorkommen von Harnstoff und von Urease in höheren und niederen Pflanzen ist seit langem bekannt. Die Rolle der Urease im pflanzlichen Stoffwechsel wurde erst kürzlich von GRASSMANN u. MÜLLER (1951) folgendermaßen gekennzeichnet: „Die allgemeine Bedeutung der pflanzlichen Urease liegt in der Bereitstellung von assimilationsfähigem Ammoniak für die Pflanze durch Aufspaltung des zunächst wertlosen Harnstoffs aus dem Eiweißabbau.“

Bei Weiterführung unserer Untersuchungen über die Verarbeitung von Aminosäuren und Amiden durch Mikroorganismen (STEINER u. KATING 1953, KATING 1955a, b, c) verwendeten wir zur Anzucht häufig Harnstoff-Nährböden. Für den einen Versuchsorganismus, *Endomycopsis vernalis*, war durch RAAF (1941) bekannt, daß er Harnstoff als einzige N-Quelle gut verwertet. Der gleiche Verfasser hatte eine starke Harnstoffspaltung zu Ammoniak durch *Endomycopsis* beobachtet. Aber auch zwei andere Hefen, *Willia anomala* und *Torulopsis utilis*, wuchsen in unseren Versuchen auf Harnstoff als alleiniger N-Quelle ausgezeichnet. Deshalb war die Angabe von GORR u. WAGNER (1931) überraschend, daß sie in frischen Zellsuspensionen und in Trockenpräparaten von *Torulopsis utilis* keine Ureaseaktivität feststellen konnten. Eine eingehendere Analyse dieser Verhältnisse schien uns deshalb erforderlich.

I. Material und Methodik

A. Kulturverfahren und Ernte des Versuchsmaterials

Versuchsorganismen waren die Institutsstämme der Wildhefen *Endomycopsis vernalis* Ludwig, mit dem schon STEINER (1938), HEIDE (1939) und RAAF (1941) arbeiteten; *Torulopsis utilis* (Henneb.) Lodder, Stamm Burcik 4719 und *Willia anomala* Hansen, Stamm Burcik 479. Alle drei Organismen wuchsen gut auf der rein synthetischen Nährlösung von WÖLTJE (s. JANKE u. ZIKES 1928), auch wenn wir statt Asparagin N-äquivalente Mengen von Harnstoff als N-Quelle boten. Es wurde

* Herrn Professor Dr. Dr. h. c. RICHARD HARDER zum 70. Geburtstage.

das gleiche Kulturverfahren angewendet, wie es bei HEIDE (1939) und MAAS-FÖRSTER (1955) ausführlich beschrieben worden ist: in Petrischalen wurden zu 35 g Quarzsand (Merck p.a.) 15 ml der Nährlösung gegeben, zwei Filtrierpapiere darüber gelegt und darauf die Organismen geimpft. Für die Ernte ließen sich die Hefedecken gut quantitativ von dem obersten Filtrierpapier abstreifen. Das Material wurde entsprechend unseren früheren Angaben (KATING 1955a) getrocknet und aufgearbeitet.

B. Herstellung des Trockenpulvers und Zellextraktes

Zur Gewinnung des Trockenpulvers wurde das geerntete Material auf Tonplatten ausgestrichen, im heizbaren Vacuumexsiccator bei 35° getrocknet und dann mit dem Mörser fein zerrieben. Das Trockenpulver war, in verschlossenen Glasflaschen im Dunkeln aufbewahrt, einige Wochen lang enzymatisch aktiv. — Der frische Zellextrakt wurde folgendermaßen gewonnen: Nach 4 Tagen Kulturdauer wurde die Hefemasse zentrifugiert, gewaschen und anschließend mit Kieselgur (Merck) zerrieben. Danach wurde 8 Std lang mit steriler Phosphatpufferlösung (pH 7) extrahiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die klare Lösung sofort für die einzelnen Versuchsansätze verwendet (Einzelheiten der Ansätze jeweils im Versuchsteil).

Die Darstellung von Ureaseextrakt aus Sojabohnenmehl (Merck) erfolgte nach HEIDERMANNS u. KIRCHNER-KÜHN (1955)¹.

C. Analysenmethoden

Zu der Ammoniakbestimmung wurde die Destillationsapparatur nach PUCHER u. Mitarb. verwendet.

Fettbestimmung nach HEIDE (1939) durch Ätherextraktion des mit Kieselgur zerriebenen Trockenpilzes.

Gesamt-N-Bestimmung nach KJELDAHL im Apparat nach PARNAS-WAGNER.

pH-Bestimmungen wurden mit dem pH-Meter (Type E 1965) der Metrohm A.G., Herisau/Schweiz ausgeführt.

Zum papierchromatographischen Nachweis von Harnstoff diente das Papier Whatman 1 und als Solvens Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1). Mit p-Dimethylaminobenzaldehyd gibt Harnstoff eine intensive gelbe Farbe (Biochem. Taschenbuch, S. 1135, WACKER 1956).

II. Versuchsergebnisse

A. Wachstum und Umsetzungen auf Harnstoff-Nährlösung

In Tab. 1 sind einige Analysendaten wachsender Kulturen von *Endomycopsis vernalis*, *Torulopsis utilis* und *Willia anomala* dargestellt, denen als einzige N-Quelle Harnstoff geboten wurde.

Versuchsanordnung: 6 tägige Vorkultur der Hefen auf Malzagar. Herstellung der Impfsuspension in sterilen Schüttelkölbchen nach HEIDE (1939).

Abgeänderte Nährlösung nach WÖLTJE: 1000 ml dest. Wasser; 75 g Saccharose; 5 g Harnstoff (Merck); 5 g KH_2PO_4 (nach SÖRENSEN, Merck); 2,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (p.a. Merck).

Trockensubstanzbildung und N-Aufnahme verlaufen bei *Endomycopsis* und *Torulopsis* etwa im gleichen Tempo. *Willia* wächst langsamer. Sie nutzt auch die N-Quelle nicht in dem Maße wie die beiden anderen

¹ Herrn Professor Dr. C. HEIDERMANNS und Frau Dr. KIRCHNER-KÜHN sind wir für wertvolle Ratschläge und Hinweise zu Dank verbunden.

Organismen. Auch nach den Analysen der Restnährlösungen wird der Stickstoff von *Endomycopsis* und *Torulopsis* etwa gleich rasch assimiliert.

Wesentliche und interessante Unterschiede zwischen den einzelnen Organismen werden aber deutlich, wenn man die N-Fractionen in der

Tabelle 1. Wachstum von *Endomycopsis vernalis*, *Torulopsis utilis* und *Willia anomala* auf Wöltje-Nährlösung mit Harnstoff als N-Quelle

Alle Zahlen sind Mittelwerte von je 3 Parallelkulturen

Kultur- dauer in Std	Pilz			Nährlösung			
	Trocken- gewicht (mg)	N (mg)	Fett (mg)	Gesamt-N (mg)	NH ₄ -N (mg)	Amid-N (mg)	End- pH
<i>I. Endomycopsis vernalis</i>							
0	—	—	—	26,60	0	26,60	4,6
50	35,6	2,45	n. b.	25,20	0,10	25,10	4,6
72	142,1	7,66	9,9	17,80	0,38	17,42	4,6
78	188,8	13,70	12,2	n. b.	0,45	n. b.	4,6
98	347,4	23,60	23,6	3,10	0,15	2,95	7,0
145	351,5	22,30	25,0	4,10	2,07	0	7,2
<i>II. Torulopsis utilis</i>							
0	—	—	—	26,60	0	26,60	4,6
50	Spur	n. b.	n. b.	26,10	0	26,10	4,4
72	137,3	10,50	4,9	14,10	0	14,10	4,0
78	189,9	13,30	8,2	n. b.	0	n. b.	4,2
98	322,0	22,90	12,5	3,73	0	3,73	5,8
145	348,7	23,60	24,3	1,70	0,11	0	6,1
<i>III. Willia anomala</i>							
0	—	—	—	26,60	0	26,60	4,6
50	Spur	n. b.	n. b.	27,00	0	27,00	4,4
72	70,1	4,85	1,3	20,30	0	n. b.	4,4
78	104,0	7,70	2,0	18,10	0	n. b.	4,4
98	199,9	10,90	13,2	14,30	0,47	13,83	4,6
145	254,9	15,10	19,3	9,10	1,90	7,20	6,4

Nährlösung betrachtet. Bei *Endomycopsis* tritt vom ersten Untersuchungstermin an NH₄-N im Außenmedium auf. Seine Menge erreicht zur Zeit des stärksten Wachstums ein Maximum. Ein zweiter, sehr viel kräftigerer Anstieg findet sich am Versuchsende (145 Std), in einem Zeitpunkt, da die gebotene N-Quelle (Harnstoff) völlig verbraucht ist. Die Verhältnisse bei der Harnstoffassimilation ähneln offenbar denen, die

wir auf Asparaginnährböden angetroffen haben (STEINER u. KATING 1953, KATING 1955a, b): Die Amidgruppen des Harnstoffs werden sehr wahrscheinlich wie diejenige des Asparagins bereits an der Zelloberfläche abgespalten; sie treten als freies Ammoniak in der Nährlösung auf. Daß sich im Falle des Asparagins — vermutlich ebenfalls durch Reaktionen an Grenzflächen der Zellen — gleichzeitig gewisse Umaminierungen abspielen, braucht in diesem Zusammenhang nicht weiter erörtert zu werden.

Anders bei *Torulopsis* und *Willia*. Auch hier wird, wie die Analysen der Nährlösung zeigen, der eingesetzte Harnstoff etwa im gleichen Maße verbraucht, wie die Pilztrockensubstanz zunimmt. Ammoniak läßt sich aber in der Nährlösung zunächst überhaupt nicht nachweisen. Es tritt erst nach 145 Std (bei *Torulopsis*) bzw. 98 Std (bei *Willia*) auf, also in einem Zeitpunkt, in welchem vermutlich die C-Quelle des Mediums erschöpft ist. Man wird diese Ammoniakausscheidung (s. STEINER u. KATING 1953, KATING 1955a) auf autolytische Abbauprozesse zurückführen dürfen.

Die Ergebnisse bei *Endomycopsis* lassen sich zwanglos so deuten, daß die Harnstoffassimilation durch eine Ureasespaltung eingeleitet wird und das noch nicht assimilierte Ammoniak sich vorübergehend im Außenmedium anhäuft. Bei *Torulopsis* und *Willia* hingegen liegen die Dinge offenbar anders.

B. Der Ort der Harnstoff-Spaltung

Durch papierchromatographischen Nachweis konnte zunächst gezeigt werden, daß entsprechend den Analysenzahlen („Amid-N“) der Tab. 1 der Harnstoff im Kulturmedium von *Endomycopsis* und *Torulopsis* schnell abnimmt und nach 145 Std völlig verschwunden ist. Bei *Willia*-Kulturen dagegen ist zum gleichen Zeitpunkt noch eine erhebliche Menge von Harnstoff nachweisbar.

Im Hinblick auf die von KATING (1955a) beim Asparaginabbau nachgewiesenen Zellgrenzflächen-Reaktionen interessierte es uns, über den Ort der Harnstoffspaltung Näheres zu erfahren. Es wurden zunächst Versuche zum Nachweis des Harnstoffs in der Zelle durchgeführt. Es wurden fettarm (und eiweißreich) vorgezogene Zellen auf zuckerfreie Harnstofflösung übergesetzt. Durch diese Versuchsbedingungen suchten wir zu erreichen, daß der in die Zellen aufgenommene Harnstoff wegen des Mangels an — inneren und äußeren — C-Quellen möglichst lange unverändert liegen blieb.

Versuchsanordnung: *Endomycopsis*, *Torulopsis* und *Willia*; 3tägige Vorkultur auf WÖLTJE-Nährlösung mit 0,6% Harnstoff als einzige N-Quelle: danach Umpflanzung der Pilzdecken auf die gleiche Nährlösung ohne Saccharose.

Zu den in Tab. 2 angegebenen Zeiten wurden je 2 Kulturschalen jeder Art geerntet, die Hefemasse in Phosphatpuffer (pH 7,0) zweimal scharf zentrifugiert, mit

Kieselgur gut zerrieben und mit 10 ml Phosphatpuffer (p_H 7,0) extrahiert. Nach Filtration wurden je 40 μ l des klaren Extraktes zur papierchromatographischen Analyse auf Harnstoff verwendet.

Wie Tab. 2 zeigt, ist in den Zellen von *Torulopsis* und *Willia* Harnstoff stets nachweisbar, niemals hingegen bei *Endomycopsis*.

Tabelle 2. Harnstoffnachweis im Mycel nach 3 tägiger Vorkultur und Umpflanzung auf Harnstoff-Nährlösung ohne C-Quelle

nach Umpflanzung Std	<i>Endomycopsis vernalis</i>	<i>Torulopsis utilis</i>	<i>Willia anomala</i>
0	—	+	+
4	—	+	+
13	—	+	+
24	—	+	+

Es wurde weiterhin versucht, bei *Endomycopsis* Urease als Exoenzym nachzuweisen. Wir benutzten hierbei folgende

Versuchsanordnung: Restnährlösungen 4 Tage alter *Endomycopsis*-Kulturen wurden vorsichtig eingeengt und mit Harnstoff als Substrat versetzt.

Die Versuche verliefen völlig negativ. In keinem Fall war eine Ammoniakbildung durch Harnstoffhydrolyse nachweisbar.

Bei der Harnstoffassimilation durch *Endomycopsis* scheinen demnach ähnliche Verhältnisse vorzuliegen wie sie von uns (STEINER u. KATING 1953, KATING 1955 a) für die Asparaginassimilation durch diesen Organismus angegeben wurden.

C. Harnstoffabbau durch Trockenpulverpräparate

Das intermediäre Auftreten von Ammoniak in der Nährlösung von *Endomycopsis vernalis* (s. Tab. 1) kann auf die Aktivität der — wahrscheinlich in der Zelloberfläche lokalisierten — Urease zurückgeführt werden. Die Harnstoffassimilation erfolgt also hier über eine vorausgehende NH_3 -Abspaltung. Unsere abweichenden Befunde bei *Torulopsis* und *Willia* treffen sich mit den vergeblichen Versuchen von GORR u. WAGNER (1932), Urease bei *Torulopsis utilis* nachzuweisen. Andererseits steht aber fest, daß Harnstoff von *Willia* und *Torulopsis* gut assimiliert wird. Weitere Versuche über die Ureaseaktivität verschiedener Präparate aus Zellen aller drei Pilzarten schienen deshalb wünschenswert. Es konnte u. a. mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß bei *Torulopsis* und *Willia* Urease nur im Zellinneren aktiv ist.

Urease katalysiert streng spezifisch die Spaltung von Harnstoff zu Ammoniak und Kohlendioxyd. Das Wirkungsoptimum ist von der Art des Puffers und der Enzymkonzentration abhängig (HOWELL u. SUMNER 1934, vergleiche hierzu auch RUSS 1956). Für 1% Urease und m/8-Citratpuffer gilt p_H 6,7 als optimal, für Phosphatpuffer dagegen etwa p_H 7,6. Das gereinigte Enzym ist empfindlich gegen

Schwermetalle, Oxydationsmittel, Fluoride, Sulfite, Monojodessigsäure und eine Reihe weiterer Stoffe (Zusammenstellung bei GRASSMANN u. MÜLLER 1951). Die Hemmung durch Schwermetalle und Oxydationsmittel kann aufgehoben werden durch Blausäure, sowie durch Sulphydrylverbindungen, Aminosäuren, hydrophile Kolloide u. a. LAIDLER u. HOARE (1949) sowie HOARE u. LAIDLER (1950) nehmen die Existenz eines Harnstoff-Urease-Wasserkomplexes bei der Spaltung an; bei hohen Substratkonzentrationen verdränge der Harnstoff das Wasser von den reaktiven Zentren, wodurch die häufig beobachtete Hemmung der Ureasewirksamkeit bei hohen Harnstoffkonzentrationen zustande käme.

Unsere Versuche mit Trockenpulverpräparaten wurden unter Beachtung all dieser Befunde durchgeführt.

Versuchsanordnung: Substrat 0,01 Mol Harnstoff (Urea puriss. cryst. Merck) in Phosphatpuffer (pH 7,0). — Zu 10 ml dieser Lösung wurden 50 mg Trockenpulver (Herstellung s. methodischer Teil S. 174.)¹ gegeben. — Zur eventuellen Enthemmung der Urease fügten wir in Parallelansätzen KCN in einer Endkonzentration von $0,5 \cdot 10^{-4}$ Mol (WARBURG 1948) bzw. eine Spur Na_2S -Lösung (RUSS 1956) hinzu. — Zu allen Ansätzen wurde außerdem eine Spur $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (p.a. Merck) gegeben. (Nach KOCHMANN 1924 aktivieren Mg^{++} -Ionen die Soja-Urease.)

Tabelle 3. Ammoniakbildung aus 0,01 Mol Harnstofflösung durch Trockenpulver, 20 Std Reaktionsdauer, Phosphatpuffer pH 7,0

Mittelwerte aus je 2 Parallelansätzen. Absolute Analysenwerte ohne Abzug des präformierten $\text{NH}_4\text{-N}$

Trockenpulver von	$\text{NH}_4\text{-N}$ ohne Harnstoff (10^{-3} mg)	End- pH	$\text{NH}_4\text{-N}$ aus Harnstoff (10^{-3} mg)	End- pH	$\text{NH}_4\text{-N}$ aus Harnstoff + KCN (10^{-3} mg)	End- pH	$\text{NH}_4\text{-N}$ aus Harnstoff + Na_2S (10^{-3} mg)	End- pH
<i>Endomycopsis</i> <i>vernalis</i>	228	6,85	2750	7,30	2778	7,28	2730	7,27
<i>Torulopsis</i> <i>utilis</i>	89	6,77	66	6,82	82	6,70	80	6,70
<i>Willia</i> <i>anomala</i>	200	6,80	186	6,75	180	6,70	180	6,75

Die Ergebnisse eines solchen Versuchs sind in Tab. 3 dargestellt. Nur in den Ansätzen mit *Endomycopsis*-Trockenpulver ist eine Urease-Wirkung festzustellen. Da die als Substrat gebotene Harnstoffmenge $2800 \cdot 10^{-3}$ mg $\text{NH}_4\text{-N}$ entspricht, ist die Harnstoffspaltung hier fast quantitativ. Ein KCN- oder Na_2S -Zusatz ist ohne Einfluß. Bei *Torulopsis* und *Willia* entsprechen die $\text{NH}_4\text{-N}$ -Werte der Versuchsansätze durchweg den Blindwerten der Kontrollen. Eine Harnstoffspaltung ist also hier nicht nachweisbar. Nur bei *Endomycopsis* werden durch die Ammoniakbildung die pH-Werte der Versuchsansätze nach dem alkalischen Bereich verschoben. Papierechromatographische Analysen der Ansätze (60 µl

¹ Als Hinweis auf die „Funktionstüchtigkeit“ des Trockenpulvers sei erwähnt, daß die Trockenpräparate aller 3 Organismen Transaminase- wie Asparaginase-Aktivität zeigten.

Lösung je Chromatogramm) auf Harnstoff bestätigten die Ergebnisse von Tab. 3: Bei *Torulopsis* und *Willia* bleibt der Harnstoff unangegriffen liegen.

Eine Wiederholung der Versuche mit größeren Harnstoffmengen ergab grundsätzlich gleiche Ergebnisse. Eine große Zugabe von Trockenpulver erwies sich nicht als günstig, weil dadurch die p_H -Kontrolle im Ansatz erschwert wird.

Diese Versuche bestätigen sowohl die Angaben von RAAF (1941) über die Ureaseaktivität von *Endomycopsis* wie diejenigen von GORR u. WAGNER (1932) über das Fehlen der Urease bei *Torulopsis*. *Willia anomala* verhält sich in dieser Hinsicht nach unseren Befunden wie *Torulopsis utilis*.

Es wäre noch der Einwand möglich, daß die negativen Ergebnisse bei *Torulopsis* und *Willia* in einer, auch durch KCN- oder Na_2S -Zusatz nicht aufgehobenen Urease-Hemmung ihren Grund hätten. Um diese Frage zu klären, setzten wir in Versuchen entsprechend Tab. 3 nach Ende der 20stündigen Reaktionszeit Ureaseextrakt aus Sojabohnen (Herstellung s. methodischer Teil S. 174) zu.

Versuchsanordnung: 1,0 ml Sojabohnenextrakt wurde nach Beendigung der vorher beschriebenen Versuche in Parallelansätzen zu den gleichen Enzymansätzen zugefügt und 8 Std später die Reaktion unterbrochen. Dies geschah mit 2 ml einer 10% igen Na-Wolframat-Lösung und 0,5 ml 6 n HCl (RUSS 1956). Vor Beginn der Ammoniak-Analyse wurde mit 0,5 ml 6 n NaOH neutralisiert.

Tabelle 4. Ammoniakentwicklung bei nachträglichem Zusatz von Sojabohnenextrakt zu Versuchsansätzen entsprechend Tab. 3

Trockenpulver von	NH ₄ -N ohne Harnstoff (10 ⁻³ mg)	NH ₄ -N aus Harnstoff (10 ⁻³ mg)	NH ₄ -N aus Harnstoff + KCN (10 ⁻³ mg)	NH ₄ -N aus Harnstoff + Na ₂ S (10 ⁻³ mg)
<i>Endomycopsis vernalis</i>	363	2880	3080	3120
<i>Torulopsis utilis</i> . . .	265	2895	3075	3105
<i>Willia anomala</i>	391	3090	3460	3410

Das Ergebnis, dargestellt in Tab. 4, ist völlig eindeutig. In allen Ansätzen ist nunmehr der eingesetzte Harnstoff annähernd vollständig zu Ammoniak (theoretischer Wert $2800 \cdot 10^{-3}$ mg) abgebaut. Bemerkenswert ist hier lediglich eine leichte Aktivierung der Urease durch KCN und Na_2S . Diese Ergebnisse machen die Annahme einer Ureasehemmung bei *Willia* und *Torulopsis* äußerst unwahrscheinlich.

D. Harnstoffabbau durch ruhende Zellen

Bei den eben beschriebenen Versuchen mit Trockenpulver bliebe noch der Einwand bestehen, daß eine möglicherweise ursprünglich vorhandene Ureaseaktivität bei *Willia* und *Torulopsis* durch den Trocknungsprozeß

verlorengeing. Es wurden deshalb Versuche mit ruhenden Zellen durchgeführt; diese schienen gleichzeitig geeignet, die Ergebnisse mit wachsenden Zellen (Tab. 1) in nützlicher Weise zu ergänzen. Bei ruhenden Zellen ist eine Interferenz von enzymatischen Spaltungsvorgängen und von Assimilationsprozessen durch Entzug aller Nährstoffe (mit Ausnahme des Harnstoffs) weitgehend ausgeschlossen.

Versuchsanordnung: 4-tägige Vorzucht der Versuchsorganismen auf WÖLTJE-Lösung mit Harnstoff als N-Quelle. Ernte, Waschen, Zentrifugieren der Zellen, Herstellung einer dichten Zellsuspension in Phosphatpuffer (pH 7,0). Versuchsansatz: 2 ml Zellsuspension; 8 ml Phosphatpuffer (pH 7,0); dazu Harnstoff zur Endkonzentration 0,01 Mol; Spur $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; Raumtemperatur. Ammoniakanalysen nach 24 Std. Parallelansatz mit KCN-Zusatz. Kontrolle mit Pufferlösung ohne Harnstoff.

Tabelle 5. Ammoniakbildung aus Harnstoff durch ruhende Zellsuspensionen von *Endomycopsis*, *Torulopsis* und *Willia*
Mittelwerte aus je 2 Ansätzen

Versuchsorganismus	$\text{NH}_4\text{-N}$ ohne Harnstoff (10^{-3} mg)	pH	$\text{NH}_4\text{-N}$ aus Harnstoff (10^{-3} mg)	pH	$\text{NH}_4\text{-N}$ aus Harnstoff + KCN (10^{-3} mg)	pH
<i>Endomycopsis</i>						
<i>vernalis</i> . . .	130	7,00	2000	7,20	1750	7,20
<i>Torulopsis utilis</i>	30	6,95	45	6,85	30	6,75
<i>Willia anomala</i> .	Spur	6,90	Spur	6,85	Spur	6,80

Wie erwartet, sind die Ergebnisse (Tab. 5) zugleich eine Bestätigung für Tab. 3 und eine Ergänzung zu Tab. 1. Wiederum konnte nur bei *Endomycopsis*, nicht bei *Torulopsis* oder *Willia*, eine Harnstoffspaltung nachgewiesen werden. Während aber in wachsenden Kulturen von *Endomycopsis* (Tab. 1) maximal 1,7% des eingesetzten Harnstoff-N als $\text{NH}_4\text{-N}$ nachweisbar waren, offenbar deswegen, weil die Harnstoffspaltung nur wenig rascher verlief als die Aufnahme und Weiterverarbeitung des abgespaltenen Ammoniaks durch die Zellen, war hier bei ruhenden Zellaufschwemmungen zu Versuchsende mehr als 70% des eingesetzten Harnstoff-N als $\text{NH}_4\text{-N}$ nachweisbar. Es war also gelungen, die Urease-Spaltung des Harnstoffs und die assimilatorische Weiterverwendung des abgespaltenen NH_3 recht sauber zu trennen.

Durch papierchromatographische Analyse ließ sich der Nachweis führen, daß in den Ansätzen mit *Torulopsis* und *Willia* der Harnstoff tatsächlich unangegriffen liegen blieb. Es fehlt hier also nicht nur die Urease; es ist offenbar bei den ruhenden Zellen — im Gegensatz zu den wachsenden Kulturen — der „primäre Harnstoffakzeptor“ nicht vorhanden oder inaktiv.

E. Harnstoffabbau durch zellfreie Extrakte

Die bisher beschriebenen Versuche mit Zellsuspensionen oder Trockenpulver brauchten deshalb nicht schlüssig zu sein, weil immerhin noch der

Einwand möglich wäre, daß bei *Torulopsis* und *Willia* das durch eventuell im Zellinnern lokalisierte Urease freigesetzte Ammoniak nicht ins Außenmedium hinauszutreten vermag. Es wurden deshalb Versuche mit zellfreien Extrakten durchgeführt, die in sehr schonender Weise hergestellt wurden.

Versuchsanordnung: Herstellung der Extrakte aus Zellen, die auf Harnstoffmedium vorgezogen worden waren, s. S. 174.

5 ml des zellfreien Extraktes in Phosphatpuffer (p_H 7,0) wurden mit Harnstoff zur Endkonzentration von 0,02 Mol und einer Spur Mg^{++} versetzt. Analyse auf NH_4^+ nach 24 Std.

Parallelansätzen wurden nach Ende der 15stündigen Versuchszeit 1,5 ml Sojabohnenextrakt zugesetzt. Analyse nach 15 + 8 Std.

Tabelle 6. Ammoniakbildung aus Harnstoff durch zellfreie Extrakte

Werte in Klammern: nach Zusatz von Sojabohnenextrakt. Mittelwerte aus je 2 Ansätzen

Zellextrakt von	NH_4 -N ohne Harnstoff (10^{-3} mg)	End- p_H	NH_4 -N aus Harnstoff (10^{-3} mg)	End- p_H	NH_4 -N aus Harnstoff + KCN (10^{-3} mg)	End- p_H
<i>Endomycopsis</i> <i>vernalis</i> . . .	258 (484)	7,0	3058 (3230)	7,46	3048 (3280)	7,52
<i>Torulopsis utilis</i>	120 (515)	6,85	88 (3110)	6,90	105 (3090)	6,95
<i>Willia anomala</i> .	70 (354)	6,96	65 (2970)	6,96	75 (3050)	6,98

Wie Tab. 6 zeigt, läßt sich auch bei den Ansätzen mit zellfreien Extrakten wiederum nur für *Endomycopsis* eine Harnstoffhydrolyse feststellen, hingegen nicht einmal in Spuren bei *Torulopsis* und *Willia*. Die positiven Ergebnisse bei *Endomycopsis* beweisen auch, daß die negativen Befunde bei *Willia* und *Torulopsis* keinesfalls auf methodische Mängel zurückzuführen sind. Anzucht des Versuchsmaterials, Vorbereitung und Durchführung der Versuche erfolgten bei allen drei Organismen in völlig gleicher Weise. Eine Ureasehemmung bei *Torulopsis* und *Willia* wird, ähnlich wie in den Versuchen von Tab. 3 u. 4 (s. S. 178 f.), durch die Parallelansätze mit Sojaextrakt-Zugabe ausgeschlossen. Selbst eine geringe Ureaseaktivität von *Torulopsis* und *Willia* hätte sich durch einen Anstieg des NH_4 -N im Ansatz bemerkbar machen müssen.

Wir kommen damit zwangsläufig zum Schlusse, daß bei gewissen Organismen die Assimilation des Harnstoffes, im Gegensatz zu der allgemein vertretenen Meinung (s. S. 173), nicht auf dem Wege über eine einleitende, durch Urease bewirkte Abspaltung von Ammoniak vonstatten geht.

*F. Untersuchung der Ammoniakproduktion
in Oberflächenkulturen*

Bei den in Tab. 1 wiedergegebenen Kulturversuchen hatte sich gezeigt, daß in Harnstoffkulturen von *Torulopsis* und *Willia* in den ersten Tagen kein Ammoniak im Nährmedium nachweisbar ist, obgleich die Organismen auf Kosten des als N-Quelle gebotenen Harnstoffes kräftig wachsen. Erst nach 96 Std Kulturdauer (bei *Torulopsis* nach 145 Std!) tritt Ammoniak auf. Ist dieses Ammoniak, wie wir vermuten, ein Produkt des Abbaus zelleigener N-Verbindungen bzw. von Autolysevorgängen, wie sie in alternen Kulturen auf den verschiedensten N-Quellen regelmäßig festgestellt werden können, oder wird am Ende doch auch bei *Willia* und *Torulopsis* in gewissen physiologischen Zuständen eine Urease wirksam? Für die Beantwortung dieser Frage schien uns die Untersuchung von Kulturen zweckdienlich, die zunächst bei reichlicher N-Gabe (also arm an N-freien Reserven) vorgezogen und sodann auf kohlenhydratfreie Nährlösung übertragen wurden.

Versuchsanordnung: *Endomycopsis*, *Torulopsis*, *Willia*. 3tägige Vorkultur auf WÖLTJE-Lösung mit 0,6% Harnstoff. Umpflanzung auf neue Nährlösung ohne Saccharose.

Es genügt, die Ergebnisse hier kurz zu besprechen, da ein ähnlicher, aber erweiterter Versuchsansatz weiter unten (Tab. 7) ausführlicher dargestellt wird.

In der *Endomycopsis*-Kultur zeigte sich, wie zu erwarten war, eine sehr starke Ammoniakfreisetzung durch die Tätigkeit der Urease (12,10 mg $\text{NH}_4\text{-N}$ nach 15 Std). Der pH -Wert der Nährlösung ging bereits nach 13 Std in den alkalischen Bereich (8,2); die Kulturschale entwickelte einen starken Ammoniakgeruch.

Nach 24stündiger Versuchsdauer war das Pilztrockengewicht je Kulturschale von 145,5 auf 104,5 mg abgesunken. Der Gesamt-N des Pilzes hatte von 11,4 auf 6,43 mg abgenommen. Diese Abnahme setzte aber erst nach 13 Std Versuchsdauer ein. Von diesem Zeitpunkt an muß man also, beim Fehlen äußerer und nach Erschöpfung der inneren C-Quellen mit einem starken Abbau zelleigener N-Verbindungen bzw. mit Autolysevorgängen rechnen, was nicht ausschließt, daß diese auch schon früher in gewissem Umfange einsetzen.

Allerdings zeigten auch die Kulturen von *Torulopsis* und *Willia* $\text{NH}_4\text{-N}$ in der Nährlösung: *Torulopsis* nach 5 Std 0,96 mg, nach 13 Std 2,55 mg; *Willia* 0,23 mg nach 5 Std, 0,98 mg nach 13 Std. Stammt dieses Ammoniak aus autolytischen Abbauvorgängen oder aus einer Harnstoffspaltung?

Da die Ergebnisse dieser Versuche in Widerspruch stehen mit den in Tab. 5 dargestellten, bei denen ruhende Zellsuspensionen von *Torulopsis* und *Willia* keine Ammoniakbildung auf Harnstoffsubstrat zeigten,

prüften wir das Zellmaterial unseres jetzigen Versuches nochmals entsprechend dem Versuch von Tab. 5 auf Ureaseaktivität.

Versuchsanordnung: Je eine Kultur von jedem Organismus wurde geerntet, gewaschen, zentrifugiert, in 15 ml Phosphatpuffer (p_H 7,0) unter Zugabe von Mg^{++} mit 0,02 Mol Harnstoff inkubiert. Zur Kontrolle dienten Parallelansätze ohne Harnstoff.

Die Ergebnisse waren auch hier die gleichen wie in Tab. 5. Bei *Torulopsis* und *Willia* ließ sich kein Unterschied der Werte des NH_4 -N zwischen den Ansätzen mit und ohne Harnstoff feststellen, während *Endomycopsis* wie üblich eine starke Ureasetätigkeit erkennen ließ. Die geringen NH_4 -Mengen in den Oberflächenkulturen von *Willia* und *Torulopsis* lassen sich also nicht damit erklären, daß diese beiden Organismen unter den betreffenden Versuchsbedingungen ureaseaktiv sind.

Die bei *Torulopsis* und *Willia* beobachteten Unterschiede der Ammoniakproduktion bei Oberflächenkulturen und in Suspensionen lebender Zellen könnten möglicherweise auf eine verschiedene O_2 -Versorgung zurückzuführen sein. Näheren Aufschluß hierüber sollte eine weitere Versuchsreihe liefern.

Versuchsanordnung: 4 tägige Vorkultur auf WÖLTJE-Lösung mit 0,6% Harnstoff. Hierauf: 1. Analyse von je 3 Parallelkulturen. — 2. Übertragung von je 3 Parallelkulturen auf WÖLTJE-Lösung ohne N und ohne C. Aufarbeitung nach 24 Std. — 3. Übertragung von je 6 Parallelkulturen auf WÖLTJE-Lösung mit 0,6% Harnstoff ohne C (Saccharose): a) 3 Parallelkulturen wie üblich frei an der Luft; b) 3 Parallelkulturen in einem mit N_2 -Gas durchströmten Exsiccator, der außerdem mit alkalischer Pyrogallol-Lösung beschickt wurde.

Aufarbeitung von a) und b) nach 5 Std. — 4. a) und b) wie 3., aber Aufarbeitung nach 24 Std.

In Tab. 7 gibt die Reihe 2 zunächst die Blindwerte für die übrigen Versuche, d. h. diejenigen Ammoniak-Mengen, welche bei Fehlen einer äußeren N- (und C-) Quelle ins Substrat ausgeschieden werden. Dieser NH_4 -N kann nur aus dem Abbau zelleigener N-Verbindungen stammen.

Unter den Versuchsbedingungen war nach Überpflanzung der Organismen auf C-freies Medium nur mehr ein geringes Wachstum zu erwarten. Tatsächlich zeigt in allen Fällen das Pilztrockengewicht innerhalb von 24 Std sogar eine deutliche Abnahme; lediglich bei *Willia* ist nach 5 Std (Reihe 3) eine kleine Substanzzunahme feststellbar. Hand in Hand mit dem Abbau von Zellsubstanz geht die Freisetzung von NH_4 -N. Ihr Ausmaß ist von Versuch zu Versuch sehr verschieden.

Bei *Endomycopsis* tritt eine starke Harnstoffspaltung ein, die sich in einer NH_4 -Anhäufung und in deutlicher Alkalisierung des Nährmediums äußert. Vorhandensein oder Ausschluß von O_2 (Reihe 3a, b, 4a, b) sind dabei erwartungsgemäß ohne Wirkung.

Anders bei *Torulopsis* und *Willia*. In den O_2 -freien Versuchen wird von *Torulopsis* nach 24 Std der NH_4 -Blindwert der Kontrolle knapp erreicht, bei *Willia* ein wenig überschritten. Dagegen zeigen die aeroben

Tabelle 7. Vergleich der Ammoniakbildung im Nährmedium von normal und ohne O₂ kultivierten Kulturen nach Umpflanzung auf Nährlösungen ohne C-Quelle.

Alle Werte sind aus je 3 Parallelansätzen gemittelt. Der Gesamt-N in der Nährlösung betrug zum Zeitpunkt der Umpflanzung 26,6 mg

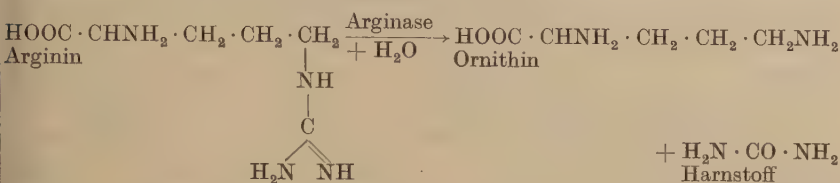
Spalte Nr.	Kultursatz und Kulturdauer	<i>Endomycopsis vernalis</i>			<i>Torulopsis utilis</i>			<i>Willia anomala</i>		
		Trockengewicht (mg)	NH ₄ -N in Nährlösung (mg)	End- pH	Trockengewicht (mg)	NH ₄ -N in Nährlösung (mg)	End- pH	Trockengewicht (mg)	NH ₄ -N in Nährlösung (mg)	End- pH
1	Zeitpunkt der Umpflanzung . .	310,9	0	—	300,8	0	—	204,6	0	—
2	24 Std, ohne C- und N-Quelle	287,4	1,86	6,4	286,5	0,73	6,0	177,4	0,97	5,8
3	5 Std, mit Harnstoff a) mit O ₂ b) ohne O ₂	310,0 315,2	9,65 10,50	— —	294,4 283,9	0,37 0	— —	208,0 222,8	1,35 0,56	— —
4	24 Std, mit Harnstoff a) mit O ₂ b) ohne O ₂	282,3 272,0	22,40 19,60	8,0 8,0	279,8 277,6	2,90 0,56	7,0 6,0	191,8 185,0	2,37 1,29	6,5 6,1

Versuche schon nach 5 Std höhere Werte des NH₄-N als die anaeroben Parallelen; nach 24 Std ist er noch weiter angestiegen. Es ist bei der NH₃-Bildung von *Torulopsis* und *Willia* im Zustand des C-Hungers also ein deutlicher Einfluß der O₂-Versorgung feststellbar. Das ist ein weiterer Hinweis dafür, daß die NH₃-Ausscheidung nicht auf ureatische Harnstoffspaltung, sondern auf Abbauvorgänge N-haltiger Zellbestandteile zurückgeht, es sei denn, daß man eine bisher in keiner Weise belegte Form einer O₂-abhängigen Harnstoffspaltung annimmt.

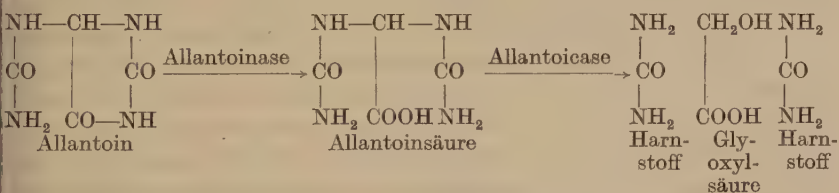
Die Ursachen für die quantitativen Unterschiede der NH₄⁺-Ausscheidung bei *Willia* und *Torulopsis* in Abhängigkeit von der O₂-Versorgung brauchen hier im einzelnen nicht erörtert zu werden. Am nächsten liegt wohl die Annahme, daß in Aerobiose zunächst noch eine gewisse Assimilation von exogenem N stattfindet, die dann von einem verstärkten Abbau von Aminosäuren oder anderen N-Verbindungen in der Zelle bis zu den Endstufen abgelöst wird, sobald die verfügbaren C-Reserven verbraucht sind.

G. Zum Abbau von Arginin und Allantoin

Arginin wird durch das von KOSSEL u. DAKIN (1904) entdeckte Enzym Arginase durch hydrolytische Aufspaltung des Guanidinrestes unter Bildung von Harnstoff und Ornithin abgebaut (s. zusammenfassende Darstellung in HOFFMANN-OSTENHOF, S. 275 ff. 1954). Die Arginase ist im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitet.



Das bei der Umsetzung von Harnsäure im tierischen Organismus entstehende Allantoin (Glyoxyldiureid) ist seit längerer Zeit auch aus dem Pflanzenreich bekannt (vgl. STIEGER 1913, der auch noch ältere Befunde über Allantoinvorkommen in Pflanzen anführt). Neuerdings ist das Allantoin als ein N-Speicher im Pflanzenreich erkannt worden (vgl. u. a. MOTHES u. ENGELBRECHT 1952, 1954). Es wird durch das Enzym Allantoinase in Allantoinsäure (PRZYŁĘCKI 1926; Zusammenfassung bei HOFFMANN-OSTENHOF, 1954, S. 272) und diese durch ein zweites Enzym, die Allantoicase, in Glyoxylsäure und zwei Moleküle Harnstoff gespalten:



Da sowohl Arginin als auch Allantoin über Harnstoff abgebaut werden, interessierte uns die Frage, ob unsere drei Versuchshefen diese Verbindungen bei der Darreichung als N-Quelle über die Harnstoff- und letztlich dann über die Ammoniakstufe nutzen. Hierzu seien anhangsweise im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen einige Befunde mitgeteilt.

Alle drei Versuchsorganismen wuchsen auf der WÖLTJE-Lösung mit Arginin (l-Argininhydrochlorid, Merck) oder Allantoin (Merck) als alleiniger N-Quelle sehr gut, wenn diese Substanzen in einer zu 1% Asparagin N-äquivalenten Menge gegeben wurden.

In Ansätzen mit Trockenpulverpräparaten von *Endomycopsis*, *Torulopsis* und *Willia* wurde weiters die NH_4^+ -Freisetzung aus Arginin und Allantoin gemessen.

Versuchsanordnung: 50 mg Trockenpulver in 10 ml Phosphatpuffer (pH 7,0) mit 0,05 Mol Arginin bzw. Allantoin. Zugabe von ATP und Mg^{++} .

Wie Tab. 8 zeigt, spaltet nur *Endomycopsis* aus beiden Verbindungen Ammoniak ab, während der $\text{NH}_4\text{-N}$ in den Ansätzen mit *Torulopsis* und *Willia* den Blindwerten der Kontrollen entspricht.

Tabelle 8. $\text{NH}_4\text{-N}$ nach 22stündiger Einwirkung von Trockenpulver auf 0,05 mol Arginin- oder Allantoinlösung
Mittelwerte aus je 2 Ansätzen

Trocken- pulver von	$\text{NH}_4\text{-N}$ aus Arginin ohne Trocken- pulver (10^{-3} mg)	$\text{NH}_4\text{-N}$ aus Allantoin ohne Trocken- pulver (10^{-3} mg)	$\text{NH}_4\text{-N}$ aus Trocken- pulver ohne Substrat (10^{-3} mg)	End- pH	$\text{NH}_4\text{-N}$ aus Arginin mit Trocken- pulver (10^{-3} mg)	End- pH	$\text{NH}_4\text{-N}$ aus Allantoin mit Trocken- pulver (10^{-3} mg)	End- pH
<i>Endomycopsis vernalis</i>	49	170	347	6,91	1600	6,96	1025	7,20
<i>Torulopsis utilis</i>	49	170	105	6,76	145	6,50	225	7,20
<i>Willia anomala</i>	49	170	210	6,93	236	6,80	350	7,20

Beim Argininabbau durch *Endomycopsis*-Trockenpulver kommt nach der Spaltung in Ornithin und Harnstoff genau so wie in den Harnstoffansätzen die Urease zur Wirkung, so daß wir die hohen $\text{NH}_4\text{-N}$ -Werte in der Reaktionslösung erhalten. Anders liegen die Verhältnisse bei *Torulopsis* und *Willia*. Im Mycel beider Organismen läßt sich Arginin als freie Aminosäure papierchromatographisch nachweisen. Wenn beide Organismen auf Arginin gut wachsen, so muß auch eine Umsetzung von Arginin stattfinden. Es ist aber keine Ammoniakbildung nachzuweisen. Die Nutzung des Arginins kann also nicht wie bei *Endomycopsis* bis zur Ammoniakstufe führen. Das beim Argininabbau gebildete Ornithin konnte in Trockenpulveransätzen von *Torulopsis* und *Willia* papierchromatographisch nachgewiesen werden. Der Stop scheint also auch hier wieder bei der Verarbeitung des Harnstoffs zu liegen, eine indirekte Bestätigung unserer früheren Versuche mit Harnstoffsubstraten. Diese Hinweise mögen vorläufig genügen, um zu zeigen, daß unter gleichen Bedingungen unsere Versuchsorganismen auch bei der Nutzung des Arginins verschiedene Wege der Verarbeitung gehen, die durch das Vorhandensein bzw. Fehlen der Urease bedingt sind. Hierüber soll später ausführlicher berichtet werden.

In den Ansätzen mit Allantoin fanden wir nach 22 Std Reaktionsdauer bei *Endomycopsis* papierchromatographisch etwas Harnstoff. Wir können schließen, daß bei diesem Organismus sowohl die Allantoinase als auch die Allantoicase aktiv werden, die dann die Voraussetzung für den Angriff der Urease sind (s. Tab. 8). Auch bei *Torulopsis* und *Willia*

können wir eine Aktivität der allantoinabbauenden Fermente annehmen. Diesen Schluß läßt einmal das Wachstum dieser Organismen auf Allantoin als N-Quelle zu, zum anderen die auch hier feststellbare Vermehrung des Harnstoffs in der Reaktionslösung. Das Nichtauftreten von $\text{NH}_4\text{-N}$ (abgesehen von den Blindwerten) steht wiederum in Parallele zu unseren Befunden über die Abwesenheit der Urease in diesen Organismen. Es muß also bei ihnen, wie beim Harnstoff, auch für Arginin und Allantoin ein Weg der Nutzung angenommen werden, der keine Ureaseaktivität voraussetzt.

Ein anderer Versuch sollte klären, ob in Trockenpulveransätzen von *Torulopsis* unter O_2 -Einwirkung aus Harnstoff Arginin oder Allantoin $\text{NH}_4\text{-N}$ freigesetzt wird (vgl. hierzu die Diskussion zu Tab. 7, S. 182 ff.). Alle Ansätze mit 0,01 mol Lösungen der Substrate in Phosphatpuffer (pH 7,0) und Mg^{++} - und Mn^{++} -Zusatz¹ wurden 8 Std lang leicht mit Bombensauerstoff durchgast. In keinem Fall wurde eine Vermehrung des $\text{NH}_4\text{-N}$ über die Blindwerte gefunden. Das bestätigt unsere früheren Befunde und die darauf gegründeten Vermutungen.

IV. Diskussion

Bei der vorliegenden Untersuchung interessierte uns weniger die Entstehung des Harnstoffes (z. B. über den KREBS-HENSELEIT-Cyclus oder andere Wege), als vielmehr die Art und Weise, wie er wiederum in den Stickstoff-Stoffwechsel der Organismen einbezogen wird. Seitdem im Jahre 1876 MUSCULUS zum erstenmal in Bakterien die Urease fand, gilt es als feststehend, daß der „zunächst wertlose Harnstoff“ (GRASSMANN u. MÜLLER) durch Aufspaltung in Ammoniak mittels der Urease für die Pflanzen wieder nutzbar wird. Die Nutzung des Harnstoffs als einer guten N-Quelle für viele Mikroorganismen auf diesem Wege ist häufig beschrieben worden. Das Ausbleiben der Ammoniakfreisetzung aus dem Harnstoffsubstrat wurde bei enzymatischen Untersuchungen immer mit dem Fehlen der Urease interpretiert, was für den betreffenden Organismus als gleichbedeutend betrachtet wurde mit der Unfähigkeit zur Harnstoffnutzung. Wir selbst haben für unsere Untersuchungen drei Wildhefen verwendet (*Endomycopsis vernalis*, *Torulopsis utilis*, *Willia anomala*), welche alle auf Harnstoff als alleiniger N-Quelle gut wuchsen, diesen also zu assimilieren und zu sämtlichen N-haltigen Zellbausteine umzuwandeln vermögen. Nur bei *Endomycopsis* ließ sich aber Urease nachweisen. Hier verläuft also die Harnstoffassimilation — wenigstens teilweise — auf dem klassischen Wege über eine NH_3 -Abspaltung. Dagegen waren alle Versuche, bei *Torulopsis* und *Willia* eine Ureaseaktivität nachzuweisen, völlig negativ. Eine entsprechende Angabe von

¹ Mn^{++} aktiviert nach HELLERMANN u. PERKINS (1935) die Arginase.

GORR u. WAGNER (1932) für *Torulopsis utilis* wird damit bestätigt. Weder in wachsenden Kulturen noch in Ansätzen mit ruhenden Zellen, mit Trockenpulver oder mit schonend hergestellten Enzymextrakten ließ sich bei den beiden letztgenannten Organismen irgendeine Harnstoffspaltung nachweisen. Die stets positiven Ergebnisse in Parallelansätzen mit *Endomycopsis* sprechen gegen methodische Mängel. Gegen eine Hemmung einer eventuell vorhandenen Urease bei *Willia* und *Torulopsis* sind Versuche anzuführen, bei denen sofort eine rasche und kräftige Harnstoffspaltung beobachtet wurde, wenn das Enzymsystem durch *Soja*-Urease vervollständigt wurde.

Eine geringfügige Ausscheidung von NH_4^+ durch Oberflächenkulturen von *Willia* und *Torulopsis* erwies sich im Gegensatz zur Ureasespaltung des Harnstoffs als O_2 -abhängig. Sie ist höchst wahrscheinlich auf den Abbau zelleigener N-Verbindungen, sicher nicht auf Harnstoffspaltung zurückzuführen.

Alle diese Befunde führen zwangsläufig zur Annahme, daß bei gewissen Organismen (z. B. *Torulopsis* und *Willia*) das Harnstoffmolekül als Ganzes assimiliert und für die Eiweißsynthese verwendet wird.

Wie kann man sich nun eine solche Nutzung des Harnstoffs ohne vorherige NH_3 -Abspaltung vorstellen? Unsere bisherigen weiterführenden Versuche, in den freien Aminosäuren der Zellen Anhaltspunkte für die primären Assimilationsschritte des Harnstoffs zu finden, führten bisher zu keinem befriedigenden Ergebnis. In Umpflanzkulturen auf Harnstoff (und auch in Parallelkulturen auf Ammoniumsuccinat) fanden wir zwar erhebliche Konzentrationen an Citrullin unter den freien Aminosäuren, jedoch ist damit wenig gewonnen. Es besteht die Möglichkeit, daß man unter den Ureiden primäre Produkte der Assimilation des Harnstoffs findet. Von hier aus müßten dann Brücken zur Aminosäuresynthese bestehen. Versuche mit markiertem Harnstoff, die in unserem Institut leider noch nicht möglich sind, hätten vielleicht am ehesten Aussicht auf Erfolg.

Es sei hier darauf hingewiesen, daß man z. B. bei den Pyrimidinen, wobei besonders die Orotsäure als Schlüsselsubstanz für die Pyrimidinchemie angesehen wird (JOHNSON 1930, u. a.), mit Einbaureaktionen des ganzen Harnstoffmoleküls rechnet. Die Synthese von Orotsäure erfolgt durch Kondensation von Oxalessigsäure mit Harnstoff und nachfolgender Verseifung (R. MÜLLER 1897, s. a. MITCHELL u. HOULAHAN 1947).

Es ist weiter auf eine Stoffwechselreaktion hinzuweisen, bei der Amide ohne vorherige Spaltung reagierten. ARCHIBALD (1945) stellte in Leberextrakten die Bildung von Harnstoff aus Glutamin fest, ohne daß intermediäres Ammoniak frei wurde. Das harmoniert mit Befunden von LEUTHARDT (1938, 1940), der enge stoffwechselphysiologische Beziehungen zwischen Harnstoff und Glutamin feststellte, wobei aber Glut-

amin ohne Ammoniakfreisetzung aus Harnstoff und Glutaminsäure gebildet wird. In beiden Fällen wäre also an eine direkte Transamidierung Harnstoff \rightleftharpoons Glutamin zu denken.

Diese Hinweise mögen genügen. Es wird deutlich, daß bei der Harnstoffassimilation nicht in allen Fällen der Weg über die Abspaltung von Ammoniak durch Urease beschritten wird. Darauf aufmerksam zu machen, war der Hauptzweck der vorliegenden Mitteilung.

Die kurz angeführten Untersuchungen am Schluß des experimentellen Teils über den Nachweis von $\text{NH}_4\text{-N}$ bei enzymatischen Versuchsansätzen mit Arginin und Allantoin als Substrat sind eine Ergänzung der Befunde. Der Nachweis der Ureaseaktivität wird bei *Endomycopsis* durch den Nachweis von Ammoniak auf beiden Substraten erweitert, während *Torulopsis* und *Willia* Arginin und Allantoin nicht nach dem bekannten Schema über Harnstoff bis zum Ammoniak abbauen. Die anderen Möglichkeiten des Abbaues von Arginin und Allantoin, die bereits bekannt sind, sollen in diesem Zusammenhang nicht erörtert werden. Sie sind Gegenstand weiterer Untersuchungen mit unseren Versuchsorganismen. Erwähnt werden muß aber noch eine Arbeit von SHIBATA (1904), der mit Trockenpulver und Acetontrockenpulver von *Aspergillus niger* keine Abspaltung von Ammoniak aus Allantoin fand. Er kommt zu einem ähnlichen Schluß wie wir, wenn er schreibt: „daß bei der Ausnutzung dieser Verbindung für die Pilznahrung keine Abspaltung des Harnstoffs bzw. Ammoniaks erfolgt, sondern die direkte Überführung etwa in Aminosäuren durch anderweitige Ringspaltung stattfindet“ (vgl. a. CZAPEK 1901).

V. Zusammenfassung

1. *Endomycopsis vernalis*, *Torulopsis utilis* und *Willia anomala* wachsen gut auf Nährböden, welche Harnstoff als alleinige N-Quelle enthalten.

2. Auf Harnstoffkulturen ist bei *Endomycopsis* in den Zellen kein Harnstoff nachweisbar, im Nährmedium dagegen tritt Ammoniak auf. Bei *Torulopsis* und *Willia* ist Harnstoff in den Zellen gut nachweisbar; Ammoniak wird im Nährmedium junger Kulturen nicht gefunden.

3. *Endomycopsis* ist ureaseaktiv. Dagegen konnte bei *Torulopsis* und *Willia* weder in wachsenden Kulturen noch in Enzymansätzen mit ruhenden Zellen, mit Trockenpulver oder mit Zellextrakten eine Ureasewirkung gefunden werden. Versuche zur Reaktivierung einer eventuell gehemmten Urease mit KCN oder Na_2S waren erfolglos. Der Harnstoff bleibt in den Enzymansätzen mit *Torulopsis* und *Willia* unangegriffen liegen. Bei Zusatz von Soja-Extrakt wird er sofort vollständig zu Ammoniak abgebaut.

4. Es wird ein im einzelnen noch unbekannter Weg der Harnstoffassimilation bei *Torulopsis* und *Willia* gefordert, der nicht über die Spaltung durch Urease geht.

5. Alle drei Versuchsorganismen wachsen auch auf Arginin und Allantoin gut. Der Abbau beider Substanzen verläuft wiederum nur bei *Endomycopsis* bis zur Ammoniakstufe.

Die Untersuchungen wurden mit dankenswerter Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Bei der experimentellen Arbeit hatten wir die Hilfe von Fräulein KATRIN AXT.

Literatur

- ARCHIBALD, R. M.: J. of Biol. Chem. **157**, 519—523 (1945).
 CZAPEK, F.: Beitr. chem. Phys.-Path. **2**, 588 (1901).
 GORR, G., u. J. WAGNER: Biochem. Z. **254**, 1—4 (1932). — GRASSMANN, W., u. H. MÜLLER in: Physiolog. Chemie **1**, 1100ff. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1951.
 HEIDE, S.: Arch. Mikrobiol. **10**, 135—188 (1939). — HEIDERMANNS, C., u. J. KIRCHNER-KÜHN: Z. vergl. Physiol. **37**, 527—540 (1955). — HELLERMANN, L., and M. E. PERKINS: J. of Biol. Chem. **112**, 175—194 (1935). — HOARE, J. P., and K. J. LAIDLER: J. Amer. Chem. Soc. **72**, 2487—2489 (1950). — HOFFMANN-OSTENHOF, O.: Enzymologie. Wien 1954. — HOWELL, H. F., and J. B. SUMNER: J. of Biol. Chem. **104**, 619—626 (1934).
 JANKE, A., u. H. ZIKES: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. Dresden 1928. — JOHNSON, T. B.: Ber. dtsh. chem. Ges. **63**, 1974—1976 (1930).
 KATING, H.: Arch. Mikrobiol. **22**, 368—395 (1955a); **22**, 235—247 (1955b); **22**, 396—407 (1955c). — KOCHMANN, R.: Biochem. Z. **151**, 259—267 (1924). — KOSSEL, A., u. H. D. DAKIN: Hoppe-Seylers Z. **41**, 322 (1904).
 LAIDLER, K. J., and J. P. HOARE: J. Amer. Chem. Soc. **71**, 2699—2702 (1949). — LEUTHARDT, H.: Hoppe-Seylers Z. **252**, 238—260 (1938); **265**, 1—8 (1940).
 MAAS-FÖRSTER, M.: Arch. Mikrobiol. **22**, 115—144 (1955). — MITCHELL, H. K., and M. B. HOULAHAN: Federat. Proc. **6**, 506—509 (1947). — MOTHES, K., u. L. ENGELBRECHT: Flora (Jena) **139**, 586 (1952); **141**, 356—378 (1954). — MÜLLER, R.: J. prakt. Chem. **56**, 488 (1897); zit. nach HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, Handb. d. physiol. u. pathol. chem. Analyse **2**, 1234. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — MUSCULUS, M.: C. r. Acad. Sci. (Paris) **82**, 333 (1876); zit. nach Mod. Methoden d. Pflanzenanalyse **4**, 125. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.
 PRZYŁĘCKI, S. J.: Arch. internat. Physiol. **27**, 159—202 (1926).
 RAAF, H.: Arch. Mikrobiol. **12**, 131—182 (1941). — RUSS, R.: Z. vergl. Physiol. **38**, 284—302 (1956).
 SHIBATA, K.: Beitr. chem. Phys.-Path. **5**, 384—394 (1904). — STEINER, M.: Ber. dtsh. bot. Ges. **56**, 73 (1938). — STEINER, M., u. H. KATING: Naturwissenschaften **40**, 487 (1953). — STIEGER, A.: Dissertation, Zürich 1913.
 WACKER, A.: in Biochem. Taschenbuch, hrsg. von H. M. RAUEN, 1132ff. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956. — WARBURG, O.: Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten. 2. Aufl., Berlin 1948.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen)

Untersuchungen über Ernährung und Fruchtkörperbildung von Myxobakterien *

Von

EVA-MARGARETE NOLTE

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Juli 1957)

Die erste Literaturzusammenstellung über die Physiologie der Myxobakterien ist in JAHNS umfassender Polyangidenarbeit (1924) enthalten; einen weiteren Überblick geben H. u. S. KRZMIENIEWSKI (1926) und, insbesondere über ernährungsphysiologische Fragen, OETKER (1953). Die zuletzt von OETKER im Anschluß an QUEHL (1906), GEITLER (1925) und gleichzeitig mit SINGH (1947a) durchgeführten Fütterungsversuche mit Bakterien, Hefen und Algen machten es wünschenswert, noch andere Organismen zu verfüttern und dadurch und auf anderen Wegen die Bildungsbedingungen der Fruchtkörper zu klären.

Die Fruchtkörperbildung der Myxobakterien ist von BAUR (1905), VAHLE (1910), JAHN (1915, 1924), GEITLER (1925), KÜHLWEIN (1952b, 1953) sowie HESSELTINE u. FENNELL (1955) teils auf chemische, teils auf physikalische Ursachen zurückgeführt worden. Außerdem scheinen eigene Stoffwechselprodukte eine Rolle zu spielen. So hat LEV (1954) gefunden, daß durch Agar hindurch die eigne Art zur Fruchtkörperbildung angeregt wird, fremde Arten dagegen nicht; bei *Sporocytophagen* und *Cytophagen* scheinen umgekehrte Verhältnisse zu herrschen (TCHAN u. GIUNTINI 1950): *Sporocytophaga* bildet gegen *Sporocytophaga* eine hemmende Substanz, gegen *Cytophagen* aber nicht.

In den nachstehend geschilderten Versuchen sollte vor allem dieser Beeinflussung der Fruktifikation durch die eigne und durch fremde Arten nachgegangen werden. Untersuchungen über den Einfluß verschiedener organischer und auch anorganischer Substanzen dienten dazu, zunächst einmal einen gewissen Einblick in die Reaktionsweise der Versuchsobjekte auf verschiedene Einflüsse zu gewinnen, bevor die Hauptfrage nach der stofflichen Grundlage für die Fruchtkörperbildung in Angriff genommen wurde.

I. Experimenteller Teil

A. Versuchsmaterial und -bedingungen

1. Organismen und Substrate. Die Untersuchungen wurden durchgeführt mit *Myxococcus fulvus* Cohn (nachstehend meist einfach *fulvus* genannt), *M. stipitatus* Thaxter (*stipitatus*), *M. virescens* Thaxter (*virescens*) und *Podangium erectum*

* Dissertation der Mathem.-Naturwiss. Fakultät der Universität Göttingen.

Schroeter (*Podangium*)¹. Für diese Organismen wurden bei den beschriebenen Versuchen stets folgende Nährböden benutzt:

Für *fulvus* und *stipitatus*: Kartoffel-*Coli*-Agar (= Kart.-*Coli*-Agar); für *virescens*: Dextrose-Hefe-Agar (= Dextr.-Hefe-Agar); für *Podangium*: Kartoffel-*Staphylococcus aureus*-Agar (= Kart.-*Staph.*-Agar).

Wenn von Nähragar gesprochen wird, sind immer diese Substrate gemeint. Bei allen Versuchen wurden Preßglas-Petrischalen mit einheitlichem Bodendurchmesser von 8,8 cm benutzt, die mit 20 cm³ Nährboden gefüllt wurden.

Zur Herstellung von Kart.-*Coli*- bzw. Kart.-*Staph.*-Agar wurde von 4 Petrischalen mit 3 Tage alten Bakterienkulturen² der oberflächliche Bakterienbewuchs mit einem Nickelspatel abgehoben, in je 100 cm³ eines 2°igen Kartoffeldekokts (mit über Quarz destilliertem Wasser) verrührt und mit 2° Agar (12 Std gewässert) autoklaviert. Der Dextr.-Hefe-Agar ist von NORÉN (1950b) übernommen worden und besteht aus 0,5° Dextrose³, 0,2° Hefeextrakt (20° ig), 0,2° Pepton⁴ und 2° Agar. Später wurde allen drei Nährböden ein 2°iger Zusatz von 2°igem Weizenkeimdekot (Weiz.) gegeben, durch den das Wachstum gesteigert wurde, die Befunde sich aber nicht grundlegend änderten. Die Futterbakterien wurden im Flächenausstrich auf Probacitagar in Petrischalen gehalten (2° Agar, 1° Probacit⁵, 1° Glucose, 1° Pepton, pH 7), und zwar bei 25° C. Die Futterorganismen wurden nach Abhebung mit einem Nickelspatel im dekantierten und filtrierten Kart.- bzw. Kart.-Weiz.-Dekot aufgeschwemmt und mit dem Agar autoklaviert. Der pH-Wert jedes Nährbodens betrug 6,5—7 (Einstellung mit Bromthymolblau). Die Sterilisierung wurde im Autoklaven bei 120° C vorgenommen. Die Bebrütung aller Versuche fand bei 25° C im dunklen Thermostaten statt.

Herkunft der weiteren Futterorganismen. Die *Aspergillus*-Kultur stammt aus dem Mikrobiologischen Institut in Göttingen, ein Teil der Grünalgen, die Phycomyceten, Ascomyceten, Basidiomyceten und die Acrasiee aus dem Pflanzenphysiologischen Institut und ein anderer Teil der Grünalgen und *Anabaena cylindrica* aus der Algensammlung der Botanischen Anstalten in Göttingen.

Anzucht der Futterorganismen. Die Grünalgen-Vorzuchten erfolgten auf KNOP-Agar [1 ltr H₂O; 18 g Agar; 1 g Ca(NO₃)₂; 0,25 g KH₂PO₄; 0,25 g MgSO₄; 0,01 g FeCl₃], die *Anabaena*-Anzucht auf GERLOFF-Agar [GERLOFF 1950: 1 ltr H₂O; 18 g Agar; 0,04 g Ca(NO₃)₂; 0,01 g K₂HPO₄; 0,025 g MgSO₄; 0,02 g Na₂SiO₃; 0,003 g Ferricitrat; 0,003 g Citronensäure]. Die Phycomyceten benötigten verschiedene Pepton-Malz-Nährböden (*Phlyctochytrium*: 0,5° Pepton, 1° Biomalz, 1,5° Agar. *Saprolegnia* und *Allomyces*: 0,3° Pepton; 1° Biomalz; 1,5° Agar), die höheren Pilze einen 5°igen Biomalzagar und die Acrasiee einen 0,9°igen NaCl-Agar mit lebendem *Escherichia coli*-Ausstrich. — pH-Wert, Sterilisation und Bebrütung wie oben.

2. Durchführung der Versuche. Geimpft wurde von 10—20 Tage alten Anzuchten die Versuche selbst wurden über 10—15 Tage beobachtet, und zwar erfolgte jeden 5. Tag eine Revision. Die Angaben in den Tabellen beziehen sich auf die 2. Revision nach 10 Tagen. In einzelnen Fällen mußte auch täglich beobachtet werden. Auf

¹ Die Kulturen stammen aus dem Pflanzenphysiologischen Institut in Göttingen und wurden schon von Frl. OETKER benutzt. Aus neu untersuchten Boden- und Mistproben aus der Umgebung Göttingens und aus Erd- und Termitenhügelproben aus Liberia und Dakar konnten keine anderen Arten isoliert werden. Am häufigsten trat bei sämtlichen Ansätzen *fulvus* auf, *stipitatus* in geringerer Menge.

² Sämtliche Bakterienstämme aus dem Mikrobiologischen Institut in Göttingen.

³ Dextropur der Deutschen Maizena-Werke G.m.b.H., Hamburg.

⁴ Witte.

⁵ Maggi-Gesellschaft.

jede Versuchsschale wurden mit der Impfnadel 4 Fruchtkörper gesetzt (Abb. 1); meist bildeten 5 Schalen (= 20 Parallelen) eine Testserie. Die Sporen der übertragene Fruchtkörper keimten bald zu neuen vegetativen Stäbchen aus, die nach allen Seiten vordrangen, bis sie sich wiederum zu Fruchtkörpern differenzierten, und zwar stets in Ringen angeordnet. Durch Auflösung der toten Futterbakterien entstanden im Agar im Umfang der Kolonie lysierte Zonen. Ein solcher sogenannter Klärungshof gibt genau den Bereich an, bis zu dem die Stäbchen auf ihrer Nahrungssuche konzentrisch vorgedrungen sind. Der Fruchtkörperring fällt aber nie mit dem Rand der Lysiszone zusammen, sondern entsteht auf dem bereits von Bakterien befreiten durchsichtigen Agar. Bei weiterer Entwicklung beginnt schließlich die Autolyse der Fruchtkörper. — Der Zuwachs einer Kolonie wurde am Durchmesser der Lysiszone gemessen. Die Fruktifikationsintensität wurde in Zahlen ausgedrückt: Ein voll ausgebildeter Fruchtkörper erhielt die Ziffer 1, seine Anlage die Ziffer 2, der vegetative Schwarm wurde mit 3 und fehlendes Wachstum mit 4 bezeichnet. Zwischenstadien wurden entsprechend mit 4—3, 3—2 und 2—1 bezeichnet, so daß 7 Stufen gegeben waren.

Mitunter war die Entwicklung so lebhaft, daß bei der 2. Revision bereits Autolyse der Fruchtkörper eingetreten war. Dann diente der Lysisonendurchmesser indirekt zur Bewertung der Fruktifikationsintensität, da beide fast immer parallel gehen (vgl. Abb. 4b, S. 205).



Abb. 1. Fruktifikation von *Myxococcus fulvus* auf 10% igem Kokosmilch-Zusatzagar. Um die 4 aufgeimpften Fruchtkörper (weiße Punkte) herum haben sich nach 10 Tagen \pm dicht aufeinander folgende Fruchtkörperringe gebildet. 0,5mal

B. Ernährungsphysiologische Versuche

Die Ergebnisse des ernährungsphysiologischen Teils sind in Tab. 1 zusammengefaßt; sie werden nachstehend besprochen. Bei den Aminosäuren ist nur die Förderung bzw. Hemmung angegeben (+ schwache Förderung, ++ Förderung, — Hemmung), sonst immer der betreffende Fruktifikationsgrad von 4—1 (1 am besten).

1. Vorversuche

In Agar- bzw. Gelatine-Stichkulturen bildeten alle vier Versuchsorganismen Fruchtkörper bzw. Fruchtkörperanlagen sowohl im Stichkanal wie auf der Oberfläche des Nährbodens außer *Podangium*, das im Kanal besser fruktifizierte als bei größerer O₂-Zufuhr. Wenn die Bakterien aber in streng anaerober Kultur gehalten wurden, bildeten sie keine Fruchtkörper. Die geringe O₂-Menge im Stichkanal war also unerläßlich. — Während der Agar sich bei keinem der vier Organismen zersetzte, wurde die Gelatine von allen verflüssigt. Für *fulvus*, *stipitatus* und *virescens* ergab sich ein Abbau der Gelatine bis zur Albumose, für *Podangium* bis zum Pepton.

Außer durch Gelatine-Verflüssigung werden die proteolytischen Fermente durch Caseinabbau gekennzeichnet. In Milchagar bildeten alle vier Myxobakterienarten einen durchsichtigen Hof um ihre Kolonie herum, der das peptonisierte Casein anzeigte.

Einfluß verschiedener Agarsorten: Zur Prüfung des Einflusses verschiedener Agarsorten wurden die Myxobakterien auf 2% ige Agarplatten geimpft. Während pulverisiert gekaufter Agar nur geringes Wachstum zuließ, bildeten sich auf Fadenagar (Merck, Darmstadt) einige Fruchtkörperanlagen. Auf Blattagar¹ gingen die vegetativen Stadien stets in Anlagen über, so daß für spätere Versuche mit Nährstoffzusatz hiervon die beste Fruchtkörperentwicklung zu erwarten war. Die optimale Agarkonzentration war 2%, aber ab 0,8% fand bereits Fruchtkörperbildung statt. Auf einem Gemisch von 1% Agar und 5% Gelatine wuchsen alle untersuchten Myxobakterien nur vegetativ, doch bildete *stipitatus* sehr dicke Fäden und färbte sich intensiv orangerot.

Bei einem Vergleich zwischen Carrageen (3%), Gummi arabicum (60%) und Tragant (1,5%) wurde nur auf Carrageen Fruchtkörperbildung erzielt, und zwar bildete sich lediglich ein einziger feiner, dünner Fruchtkörpererring von perl-schnurartiger Gleichmäßigkeit.

Als optimale Schichtdicke für den meist verwendeten Kart.-Coli-Agar (2%) ergab sich eine Höhe von 4–5 mm (25–30 cm³ Inhalt bei Preßglasschalen mit einheitlichem Bodendurchmesser von 8,8 cm). Im allgemeinen wurde aber bei den Versuchen mit 3 mm-Schichten gearbeitet (20 cm³).

2. Hauptversuche

a) *Fütterung mit Bakterien* (Tab. 1). Versuche mit anderen Futterbakterien als *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* ergaben für die Fruchtkörperbildung keine grundsätzlich neuen Befunde.

Aerobacter aerogenes-Zusatz zu Kart.-Agar (Inhalt von 4 Schalen/100 cm³) bewirkte für *fulvus* und *stipitatus* zwar bessere Fruktifikation als *E. coli*, aber die Fruchtkörper traten in wellenförmigen Wülsten auf und waren anomal geformt. Ähnliche Unregelmäßigkeiten fand OETKER (1953) für *Podangium* mit *Saccharomyces cerevisiae* Saaz.

Ein Zusatz von *Bacterium ferrugineum* zu Kart.-Coli-Agar (Inhalt von 4 Schalen je 100 cm³) ergab bessere Fruktifikation und größeren Durchmesser der Lysiszone als Kart.-Coli-Agar allein, während ein Zusatz zu Kart.-Agar die gleichen Resultate lieferte wie Kart.-Coli-Agar.

b) *Fütterung mit Algen*. Zur Nachprüfung der Oetkerschen Ergebnisse (1953) wurden Versuche mit 7 Grünalgen angesetzt. Die Algen wurden nach 4 Wochen Anzucht mit einer Impföse in Form von je 4 Rechtecken auf den Agar der Versuchsschalen ausgestrichen (jeweils 1 Impföse voll, Ösendurchmesser = 2 mm). Bis auf geringe Unterschiede konnten die Befunde OETKERS bestätigt werden. *Podangium* verhielt sich sehr ähnlich wie *fulvus*.

Um den Algen während der Verfütterung trotz des nicht nährenden Substrats (reiner Agar) weitere Wachstumsmöglichkeiten durch Photosynthese zu geben und diesen Einfluß auf die Myxobakterien zu beobachten, wurde die Hälfte der Testschalen mit Algen und Myxobakterien in Licht-Dunkel-Wechsel gebracht. Die anderen bleiben in ständigem Dunkel. Die Unterschiede zwischen Dunkel- und Licht-Kulturen waren aber nur gering, und zwar bildeten sich in den Dunkelschalen größere Fruchtkörper, und die Algenzellen waren zum Teil deformiert. Da im

¹ Kurt Huss, Kiel, Ringstraße 55 (direkter Japanbezug).

Dauerdunkel der Aneuringehalt von Grünalgen ansteigt (GERDES 1951), ist auch ein Einfluß des Aneurins auf die Fruchtkörperbildung möglich.

Auf lebender *Anabaena cylindrica* bildeten *fulvus* und *stipitatus* Fruchtkörperanlagen und Fruchtkörper, *virescens* nur vegetative Zellen und *Podangium* Anlagen. Die Blaualgenzellen wurden dabei nicht zerstört. Auf abgetöteter *Anabaena* zeigte *fulvus* nur Anlagen. — Wenn die Myxobakterien neben den Algenausstrich geimpft wurden, bildeten sich nur dort Fruchtkörper bzw. Anlagen und nicht auch auf der Futteralge.

c) *Fütterung mit Phycomyceten* (Tab. 1). Gute Fruktifikation von *fulvus* trat auf *Phlyctochytrium* spec. (Stamm B 45 I)¹ ein. Die vegetativen *fulvus*-Stäbchen krochen zwar über die Futterflocke hinaus, kamen jedoch nicht zur Fruchtkörperbildung. *Podangium* wuchs auf *Phlyctochytrium* ebenfalls mit Fruchtkörpern, während OETKER (1953) nur für einige Myxococcen Fruktifikation feststellte. Die teilweise Auflösung des Pilzmycels, über die OETKER berichtet, konnte jedoch bestätigt werden.

Von *fulvus* wurden ebenfalls Fruchtkörper auf *Saprolegnia* spec. und *Allomyces* spec. (SV 59)¹ gebildet. Bei mikroskopischer Kontrolle erwies das Mycel von *Saprolegnia* sich als nicht beschädigt; das von *Allomyces* war aufgelöst, die Dauersporangien dagegen nicht. — Die Einflüsse von lebenden und abgetöteten Gaben der drei Phycomyceten gehen aus Tab. 1 hervor.

d) *Fütterung mit höheren Pilzen*. Auf lebendem *Aspergillus niger*-Ausstrich mit Conidienträgern wuchsen die untersuchten Myxobakterien nicht einmal vegetativ. Die Versuche konnten daher nur mit abgetötetem Material ausgeführt werden (Tab. 2).

Der Futterorganismus wurde dazu auf 30 cm³ einer 5%igen Biomazlösung in 100 cm³-Erlenmeyerkolben vorkultiviert, das fertig ausgebildete Mycel vorsichtig mit dem Nickelspatel in eine Petrischale gebracht, 1/2 Std im Dampftopf auf 100° C erhitzt und dann gleichmäßig in 100 cm³ reinen Agar verteilt.

Auf diesem Substrat bildete *fulvus* Fruchtkörper; *stipitatus*, *virescens* und *Podangium* brachten Anlagen hervor. Auf der 2- bzw. 3fachen Zusatzmenge des Futterorganismus wuchsen *fulvus*, *stipitatus* und *virescens* vegetativ, *Podangium* entwickelte Anlagen.

Weiter wurde das vegetative Mycel von *Fomes fomentarius*, *Lepiota cepaestipes*, *Merulius lacrymans*, *Polystictus versicolor* und *Xylaria polymorpha* als Futterquelle geprüft. Wenn die Myxobakterien neben die Impfflocken des Pilzes gesetzt wurden, krochen sie nicht an die Pilzmycelien heran (vgl. Blaualgenversuche), sondern breiteten sich unter Anlagenbildung auf dem Agar aus. Wenn sie aber auf die Impfflocken gesetzt wurden, zerstörten sie ebenfalls in keinem Falle das Mycel. Auf lebendem Material wuchsen sie kaum. Die verschiedenen Fruchtkörper-

¹ Die Stämme wurden freundlicherweise von Herrn Dr. GAERTNER, Göttingen, Pflanzenpathol. Institut, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1. Ergebnisse des ernährungsphysiologischen Teils¹. Die Zahlen geben den Fruktifikationsgrad an:

4 = kein Wachstum, 3 = vegetative Stäbchen, 2 = Fruchtkörperanlagen, 1 = Fruchtkörper; 4—3, 3—2, 2—1 = Zwischenstufen

	Futtermenge	<i>M. fulvus</i>	<i>M. stipitatus</i>	<i>M. virescens</i>	<i>Podang. erectum</i>
	Kontrolle	2	2	2	2
Bakterien	<i>Aerobacter aerogenes</i> . . .	1	1		
	<i>Bact. ferrugineum</i>	1			
Algen	<i>Stichococcus bacillaris</i> . . .	4			1
	<i>St. mirabilis</i>	1			1
	<i>Scenedesmus naegeli</i>	1			2
	<i>Sc. quadricauda</i>	1			1
	<i>Hormidium barlowi</i>	2			4
	<i>H. flaccidum</i>	4			4
	<i>Chlamydomonas eugametos</i> .	1			4
	<i>Anabaena</i> lebend	2—1	2—1	3	2
	<i>Anabaena</i> getötet	2			
Phyco- myceten	<i>Phlyctochytrium</i> leb. ² .	1	2	2	3—2
	<i>Phlyctochytrium</i> get. ³ .	1	1	2	2—1
	<i>Saprolegnia</i> leb. . . .	1	2—1	2—1	2—1
	<i>Saprolegnia</i> get. . . .	1	2—1	2	2
	<i>Allomyces</i> leb.	1	2—1	3—2	3—2
	<i>Allomyces</i> get.	1	2—1	2—1	3—2
Asco- myceten	<i>Aspergillus niger</i> leb. . .	4	4	4	4
	<i>Aspergillus niger</i> get. . .	1	2	2	2
	<i>Aspergillus niger</i> + get. ⁴ .	3	3	3	2
	<i>Xylaria polymorpha</i> . . .	2—1	2—1	3	3—2
Basidio- myceten	<i>Fomes fomentarius</i>	2—1	2—1	3—2	3—2
	<i>Lepiota cepaestipes</i>	2—1	3—2	3—2	2
	<i>Merulius lacrymans</i>	2	2	2	3—2
	<i>Polystictus versicolor</i> . . .	3—2	2	3—2	2
Acrasiee	<i>Polysphondylium violaceum</i>	2	2	2	3
organische Sub- stanzen	β -Alanin	+			
	Arginin	—			
	Asparagin	+			
	Asparaginsäure	+			
	Cystein	+			
	Cystin	+			
	Glutaminsäure	++			
	Leucin	++			
	i-Leucin	—			
	Methionin	—			
	Tryptophan	++			
	Valin	—			

¹ Für die fehlenden Tabellenwerte liegen keine Ergebnisse vor. ² leb. = lebend.³ get. = getötet. ⁴ + get. = 2- bzw. 3fache Menge des abgetöteten Mycels.

Tabelle 1 (Fortsetzung)

	Futtergabe	<i>M. fulvus</i>	<i>M. stipitatus</i>	<i>M. virescens</i>	<i>Podang. erectum</i>
organische Sub- stanzen	NORÉN III-Agar	3—2			
	Leberdekokt (10 ⁻¹⁰ —30%)	1			
	Eipulver (1—2%)	1	1 ¹	2	2
	Hefeflocken (1%)	1			
	verdautes Pepton (0,3%)	2—1			
	verdautes Trypton (0,3%)	2—1			
	Pepton (1%)	3—2			
	Pepton + Glucose (1+0,25%)	3			
	Hafermehl (1 und 5%)	2	2	3	
	Weizenkeime (1 und 2%)	1	1	2	2
	Vitamin E (0,025—0,25%)	3			
	Heteroauxin	1			2
	Kokosmilch (1, 2, 4, 10, 20%)	1			
	Hippursäure (0,001—5%)	2—1			
	weißer Zucker (1%)	3—2			
	brauner Zucker (1%)	3			
	w. Z. (0,5%) in NORÉN-Agar	2			
	b. Z. (0,5%) in NORÉN-Agar	3—2			
anorg. Sub- stanzen	Pellkartoffeln (2—20%)	2—1			
	Ca (0,001% Chlorid)	3			
	Fe (0,003% Chl. bzw. Citrat)	3			
	Knochenmehl (0,1—5%)	2—1			
	Löberde (1%)	3	3	3	3

¹ Violettfärbung.

grade der vier benutzten Myxobakterienstämme auf totem Mycel gehen aus Tab. 2 hervor.

e) Fütterung mit *Myxomyceten* und *Myxobakterien*. Die Acrasiee *Polysphondylium violaceum* ließ kaum Myxobakterienwachstum zu. *Fulvus*, *stipitatus* und *virescens* entwickelten Anlagen, *Podangium* blieb völlig vegetativ.

Wenn die Myxobakterien mit Myxobakterien selbst gefüttert wurden, ergab sich das schon wiederholt gezeigte Nicht-Ineinanderkriechen der eigenen Gattung (QUEHL 1906, JAHN 1924, GETTLER 1925), und zwar für *fulvus* auf Agar- wie auf Gipsplatten. Besonders deutliche Resultate wurden erhalten, wenn der eine von zwei nebeneinander geimpften Fruchtkörpern mit Methylenblau gefärbt wurde (Methode nach VOGT 1925 und 1929). Bei Zweiteilung eines Fruchtkörpers und Impfung der beiden Hälften nebeneinander erfolgte jedoch keine Abgrenzung der beiden neu entstehenden Wachstumsareale, sondern ein Ineinanderlaufen der Ringbildung. Die Versuche wurden auf reinem und auf Kart.-*Coli*-Agar mit demselben Ergebnis ausgeführt.

f) Fütterung mit organischen Substanzen (Tab. 1). Zunächst wurden 12 Aminosäuren¹ untersucht (Tab. 3).

Die Ergebnisse von NORÉN (1952a) konnten zum Teil bestätigt werden (Tab. 4). Glutaminsäure, Leucin und Tryptophan förderten am stärksten. Außerdem erfolgte Förderung bei Zugabe von β -Alanin (im Gegensatz zu NORÉN 1952a), Asparagin, Asparaginsäure, Cystein und Cystin. Keine Förderung ergaben im Gegensatz zu NORÉN Arginin und Methionin. —

Tabelle 2. Fruktifikation der Myxobakterien auf höheren Pilzen als Nahrungszusatz

abgetöteter Pilz	Fruchtkörperentwicklung vom 5.—25. Tag	Mittelwert
<i>Fomes fomentarius</i>	<i>M.f.</i> 3; 3; 3-2; 3-2; 3-2; 2; 2; 2; 2; 2; 2; 1; 1; 1; 1	2-1
	<i>M.s.</i> 3-2; 3-2; 2; 2; 2; 1; 1; 1; 1; 1	2-1
	<i>M.v.</i> 3; 3; 3-2; 3-2; 3-2; 3-2; 3-2; 2; 2; 2-1	3-2
	<i>P.e.</i> 3; 3; 3; 3; 3-2; 3-2; 3-2; 3-2; 2; 2; 2; 2; 2	3-2
<i>Lepiota cepaestipes</i>	<i>M.f.</i> 3; 3-2; 3-2; 2; 2; 2; 2; 2; 2; 2; 2-1; 1; 1; 1	2-1
	<i>M.s.</i> 3; 3; 3; 3; 3-2; 2-1; 1; 1	2-1
	<i>M.v.</i> 3; 3; 3; 3; 1; 1	3-2
	<i>P.e.</i> 3; 3-2; 3-2; 3-2; 2; 2; 2-1	2
<i>Merulius lacrymans</i>	<i>M.f.</i> 3; 3-2; 3-2; 3-2; 2; 2; 2; 2; 2; 2-1; 1	2
	<i>M.s.</i> 3; 3-2; 3-2; 2; 2; 2; 2; 2; 2; 2-1	2
	<i>M.v.</i> 3; 3; 2; 2; 1; 1	2
	<i>P.e.</i> 3; 3; 3; 3-2; 3-2; 3-2; 3-2; 3-2; 3-2; 2; 2	3-2
<i>Polystictus versicolor</i>	<i>M.f.</i> 3; 3; 3; 3; 3-2; 2; 2; 2-1; 1	3-2
	<i>M.s.</i> 3-2; 3-2; 3-2; 3-2; 2; 2; 2-1; 2-1	2
	<i>M.v.</i> 3-2; 3-2	3-2
	<i>P.e.</i> 3-2; 3-2; 3-2; 2; 2; 2; 2; 2; 2; 2	2
<i>Xylaria polymorpha</i>	<i>M.f.</i> 3; 3-2; 3-2; 3-2; 3-2; 2; 2; 2; 2; 2; 2; 2; 2; 1; 1; 1; 1; 1	2-1
	<i>M.s.</i> 2; 2; 2; 2; 2; 2-1; 1; 1; 1; 1; 1; 1; 1	2-1
	<i>M.v.</i> 3	3
	<i>P.e.</i> 3; 3; 3; 3; 3; 3-2; 3-2; 3-2; 2; 2; 2; 2; 2-1	3-2

Dem reinen Agar wurden verschiedene Konzentrationen von Aminosäuren zugesetzt. Bei 0,1% Zusatz ohne pH-Einstellung (Tab. 3) förderte nur Leucin, bei Berechnung auf Stickstoff unter Zugrundelegung der Konzentration von 0,1% für Alanin und pH 7,2 kamen noch Asparagin, Glutaminsäure und Tryptophan hinzu. Bei Zusatz der auf Stickstoff bezogenen Mengen zu Kart.-Coli-Agar förderten außerdem β -Alanin, Asparaginsäure, Cystein und Cystin.

Völlige Übereinstimmung der eigenen Untersuchungen ergab sich beim Vergleich (Tab. 4) mit denen von FINCK (1950), obwohl 0,001—0,005% igen

¹ Schuchhardt, München. Asparagin- und Glutaminsäure von Merek, Darmstadt.

Aminosäuregaben bei FINCK zum Teil 0,1% ige Zusätze gegenüberstanden. LOEBECK (1954) fand bei Aminosäure-Einzelgaben für *fulvus* keine merklichen Veränderungen (2 mg-%-Zusätze), stellte aber bei 16 Aminosäuren Desaminierung durch *virescens* fest.

Tabelle 3. *Myxococcus fulvus*. Wachstum und Fruktifikation auf Aminosäuren. Bedeutung der Zahlen: Fruktifikationsgrad (in Klammern Lysiszonendurchmesser in Zentimetern). Mittelwerte der 1. und 2. Revision

Aminosäure	reiner Agar + 0,1 %	reiner Agar N-Bezug, pH 7,2	Kart.-Coli-Agar N-Bezug, pH 7,2
1. β -Alanin	3 (1,8—3,5)	3 (1,5—1,9)	2 (2,2—4,1)
2. Arginin	3 (1,5—2,0)	3 (1,8—1,9)	
3. Asparagin	3 (1,8—2,0)	3 (2,0—2,2)	3 (1,8—3,0)
4. Asparaginsäure	} Nährboden- verflüssigung	3 (1,0—1,4)	2 (2,2)—1 (3,9)
5. Cystein		3 (1,5)	3 (1,9)—2 (2,1)
6. Cystin		3 (0,7—1,9)	2 (2,1—3,9)
7. Glutaminsäure		3 (0,3)—2 (0,9)	3 (2,1)—1 (3,8)
8. Leucin	3 (2,0—2,6)	3 (1,8)	3 (1,4)—1 (2,6)
9. i-Leucin	3 (1,2)	3 (0,5)	3 (1,4—2,5)
10. Methionin	3 (0,4—0,5)	3 (0,2)	3 (1,2)—2 (1,2)
11. Tryptophan	3 (0,9—1,8)	3 (1,4—2,9)	3 (1,3)—2 (2,6)
12. Valin	3 (0,2—1,0)	3 (0,4—0,7)	3 (1,6)—2 (2,8)
13. Kontrolle	3 (1,9—3,6)	3 (2,0—2,6)	3 (1,7)—2 (3,9)

Während nach NORÉN (1952a) mit Caseinhydrolysat-Lösung¹ (siehe Flüssigkeitskulturen) noch bessere Erfolge erzielt wurden als mit einem Aminosäuregemisch, bewirkte ein Zusatz der NORÉN-III - Salze zu reinem Agar keine Fruchtkörperbildung, sondern höchstens Anlagen für *fulvus* (Tab. 1).

Da HESSELTINE u. FENNELL (1955) einen der Fruchtkörperbildungssubstanz ähnlichen Stoff in der Leber annehmen, konnte vermutet werden, daß dort ein wirksameres Aminosäure- und Fermentgemisch vorliegt, als es die Caseinhydrolysat-Lösung darstellt. Dem Agar wurden daher Rinder- und Schweineleber und Rinderleber-Extrakt (Difco) in verschiedener Konzentration und mit verschiedener Vorbehandlung zugesetzt.

Dazu wurden bohngroße Stücke von frischer Leber ³/₄ Std in Kart.-Lösung gedämpft und danach die filtrierte Lösung dem Agar zugefügt und autoklaviert. Ein Vergleich zwischen Kart.-Coli-Leber-Agar und Kart.-Leber-Agar ergab das *fulvus*-Optimum eindeutig für Kart.-Leber-Agar. Auf steril filtrierter Leberlösung, die dem Agar kalt zugesetzt wurde, gediehen die Myxobakterien überhaupt nicht, weder auf Schweine- noch auf Rinderleber-Zusatz.

¹ 0,25% Caseinhydrolysat (Difco, vitaminfrei); 0,25% Asparagin; 0,1% NaCl; 0,001% CaCl₂; 0,2% K₂HPO₄; 0,01% MgSO₄; 0,0001% MnSO₄; 0,0003% Ferricitrat.

Ein Unterschied zwischen $\frac{3}{4}$ Std heiß (Dampftopf) und 24 Std kalt ausgezogener (und dann autoklavierter) Leber war nicht zu erkennen, desgleichen nicht zwischen gestückelter und im Starmix zerkleinerter.

Tabelle 4. *Einfluß verschiedener Aminosäuren auf die Fruktifikation der Myxobakterien.*
+ bedeutet stets, daß die betreffende Aminosäure verwertet wurde, nicht immer ist eine Förderung damit verbunden. Bei LOEBECK (1954) weist + oder ++ auf die Intensität der Desaminierung hin; es ist damit keine Förderung oder völlige Verwertung gekennzeichnet. *f* = *Myxococcus fulvus*, *v* = *Myxococcus virescens*

Aminosäuren	OXFORD 1947	FINCK 1950	NORÉN 1952a	OETKER 1953	LOEBECK 1954	NORÉN 1955a	eigene Befunde
Adenosin						<i>v</i> +	
β -Alanin	<i>v</i> -	<i>f</i> +, <i>v</i> -	<i>f</i> +		<i>v</i> + +	<i>v</i> -	<i>f</i> +
Arginin	<i>v</i> +		<i>f</i> +, <i>f</i> +		<i>v</i>	<i>v</i> +	<i>f</i> -
Asparagin	<i>v</i> +	<i>f</i> +, <i>v</i> +			<i>v</i>	<i>v</i> +	<i>f</i> +
Asparaginsäure .				<i>v</i> +	<i>v</i>		<i>f</i> +
Citrullin					<i>v</i>		
Cystein	<i>v</i> -						<i>f</i> +
Cystin		<i>f</i> +, <i>v</i> -			<i>v</i> +		<i>f</i> +
Cytidin						<i>v</i> +	
Glutaminsäure .	<i>v</i> +	<i>f</i> +, <i>v</i> -	<i>f</i> +, <i>v</i> +		<i>v</i>	<i>v</i> +	<i>f</i> + +
Glycin	<i>v</i> -		<i>f</i>			<i>v</i> +	
Guanosin						<i>v</i> +	
Histidin	<i>v</i> +				<i>v</i> +	<i>v</i> -	
Hydroxy-prolin .					<i>v</i>		
Leucin		<i>f</i> +, <i>v</i> -	<i>f</i> +, <i>v</i> +		<i>v</i> +	<i>v</i> +	<i>f</i> + +
i-Leucin					<i>v</i> +	<i>v</i> +	<i>f</i> +
Lysin	<i>v</i> +				<i>v</i> +	<i>v</i> -	
Methionin			<i>f</i> +, <i>v</i> +		<i>v</i> +	<i>v</i> +	<i>f</i> -
Norleucin					<i>v</i> +		
Norvalin					<i>v</i>		
Oxy-prolin					<i>v</i> -		
Ornithin					<i>v</i>		
Phenylalanin . .					<i>v</i> +		
Prolin					<i>v</i> +	<i>v</i> -	
Serin					<i>v</i> +		
Threonin					<i>v</i> +		
Tryptophan . . .			<i>f</i> +		<i>v</i> +	<i>v</i> -	<i>f</i> + +
Thymin						<i>v</i> +	
Tyrosin					<i>v</i> + +	<i>v</i> +	
Valin					<i>v</i> +	<i>v</i> +	<i>f</i> -

Das Leber-Konzentrationsoptimum lag zwischen 1,5 und 7,5%, und zwar sowohl bei Rinder- wie bei Schweineleber, bei Rinderleber-Extrakt zwischen 2 und 10%. Bei großer Verdünnung fand sich neben dem ersten Maximum ein zweites bei der Dilution D_3 ($= 10^{-3}\%$), das sich auch bei einem Vergleich von Leberlösungs-Zusatz mit Rindereserum-Zusatz¹

¹ Aus dem Hygiene-Institut in Göttingen.

(HESSELTINE u. FENNELL 1955) ergab. Untersucht wurden die Konzentrationen im Bereich von $10^{-10}\%$ bis 30% (Abb. 2).

Eine Steigerung der Leberwirkung durch Glykogenzusatz trat kaum in Erscheinung. Die Vergrößerung des Lysiszonendurchmessers von *fulvus* war bei Verdünnung bis zur 3., 4. und 5. Potenz nur geringfügig (Tab. 5).

Wie aus Tab. 1 ersichtlich ist, wurden noch weitere eiweißhaltige Futtergaben zugesetzt. Einige führten bis zur Fruchtkörperbildung.

Während mit Heteroauxin und Kokosmilch ebenfalls Fruchtkörperförderung erzielt werden konnte, wuchs *fulvus* bei Vitamin E-Zusatz nur vegetativ. Auch andere Vitamine (OETKER 1953: B, C; LOEBECK 1954) scheinen die Fruktifikation nicht zu fördern. — Auch mit kohlenhydrathaltigen Futterquellen wurde eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt, von denen die Befunde mit Pellkartoffel-Zusatz (Pell.) (KONONENKO 1937 a) einen interessanten Vergleich mit dem Grundnährsubstrat (Kart.-*Coli*-Agar) bieten.

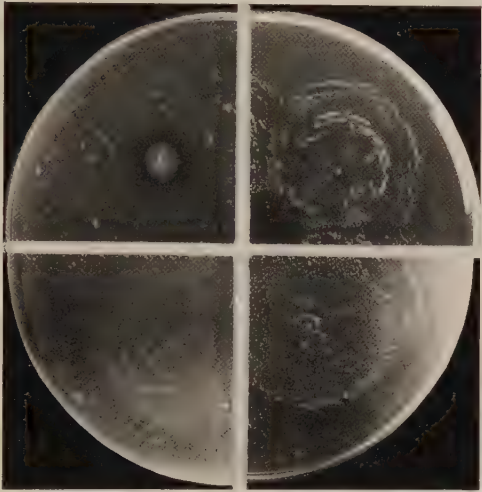


Abb. 2. Fruktifikation von *Myxococcus fulvus* auf Kart.-Leber-Agar. Leberzusatz in den Konzentrationen: links oben 1,25%, rechts oben 2,5%, rechts unten 7,5%, links unten 30%. Etwas verkleinert

Zunächst wurde ein normaler Kart.-*Coli*-Agar einem Pell.-*Coli*-Agar gegenübergestellt, und zwar in den Verhältnissen der Tab. 6.

Pell.-Agar erwies sich also nur allein als ungemein fördernd, als Zusatz zu Kart.-*Coli*-Agar (1:1) aber sogar hemmend. In einem weiteren Versuch wurde beobachtet, ob Weiz.-Zusatz den Befund veränderte oder nicht. Wieder machte sich der hemmende Einfluß der Zusammenstellung von Pell.- und normalem Kart.-Dekokt bemerkbar, und zwar fielen die Ergebnisse mit Pell.-Kart.-*Coli*-Weiz.-Agar um 10—30% schlechter als die mit Pell.-*Coli*-Weiz.-Agar aus.

Tabelle 5. *Myxococcus fulvus*. Einfluß von Glykogenzusatz auf den Fruktifikationsgrad im Bereich der Konzentrationen von 2% bis $2 \cdot 10^{-5}\%$ in Kart.-Leber-Agar (Leber = 3%). In Klammern Lysiszonendurchmesser in Zentimetern

Glykogenzusatz in %	2	2 D ₁	2 D ₂	2 D ₃	2 D ₄	2 D ₅	Kontrolle
nach 5 Tagen. .	3 (2,4)	3 (1,9)	3 (2,9)	3 (3,6)	3 (3,5)	3 (3,5)	3 (3,0)

Die höchste Fruktifikationssteigerung wurde mit Weizenkeimdekot (Weiz.) erreicht¹. Für *fulvus* und *stipitatus* ergab sich optimale Fruchtkörperbildung bei 1- und 2% iger Weiz.-Gabe. Selbst die Kontrolle mit Kart.-Coli-Agar stand hinter diesem Ergebnis zurück, so daß die fruktifikationsphysiologischen Versuche später mit Kart.-Coli-Agar + 2% igem Weiz.-Dekot durchgeführt wurden.

Tabelle 6. *Myxococcus fulvus*. Einfluß von Kart.-Coli- und Pell.-Coli-Agar auf den Fruktifikationsgrad bei verschiedenen Proportionen der Kart.- bzw. Pell.- und Coli-Mengen. Mittelwerte der Lysisonendurchmesser aus je 24 Parallelen in Prozent

Kart.: Coli	1:1*	1:2	1:3	2:1	2,5:1	3:1	3,75:1	4:1	5:1	7,5:1	Pell. 20%
Kart.-Coli	+100	+10	+40	+35	-15	-50	+15	-5	+2	-55	
Pell.-Coli	+20	-30	-30	-80		-80					+100

* 1:1 entspricht dem Verhältnis 2:4 des Grundnährbodens Kart.-Coli

g) *Fütterung mit anorganischen Substanzen*. Die Befunde sind ebenfalls aus Tab. 1 ersichtlich.

h) *Flüssigkeitskulturen*. Schließlich sollte ein flüssiges Medium gefunden werden, in dem die Myxobakterien ständig wachsen, nicht nur während weniger Passagen.

Folgende Flüssigkeitskulturen ergaben nur vegetatives Wachstum (*f* = *fulvus*, *s* = *stipitatus*, *v* = *virescens*, *P* = *Podangium*):

Dextr.-Hefe-Lösung (Konzentration wie Agar)	f,	v
Rohrzucker-Lösung (Konzentration wie Agar)	f,	v
Glaswollewasser	f, s, v,	P
Coli-Suspension (2—10 mg <i>E. c.</i> + 8 cm ³ H ₂ O)	f, s, v,	P
Staph.-Suspension (5 Petrischalen/100 cm ³ H ₂ O)	s,	P
Kart.-Coli-Lösung (Konzentration wie Agar)	f	
YOSHII-Peptonlösung 0,6/4,0 ²	f,	P
YOSHII-Peptonlösung 0,6/0,6 ³	s, v,	P
YOSHII-Peptonlösung 0,1/4,0 ⁴	f,	v, P

Anlagenbildung wurde erzielt in:

Tryptonwasser (Difco; 0,5% T. + 0,1% Agar ⁵)	f
Peptonwasser (Difco; 0,5% verdautes Pepton + 0,1% Agar)	f
Kart.-Wasser (2%)	P
NORÉN III-Lösung ⁶	s, v, P
Allium-Lösung (YOSHII 1926, 5%)	f
Daucus-Lösung (YOSHII 1926, 5%)	s
Kart.-Lösung (YOSHII 1926, 5%)	f, s

¹ Dr. Ritter u. Co., Köln-Deutz, und Keimdiät-G.m.b.H., Augsburg.

² 0,6% Pepton + 4,0% Rohrzucker + 0,1% MgSO₄ + 0,1% K₂HPO₄.

³ 0,6% Pepton + 0,6% Rohrzucker + 0,1% MgSO₄ + 0,1% K₂HPO₄.

⁴ 0,1% Pepton + 4,0% Rohrzucker + 0,1% MgSO₄ + 0,1% K₂HPO₄.

⁵ RIPPEL u. LEHMANN (1937).

⁶ NORÉN (1952a), vgl. S. 199, Fußnote 1.

YOSHII-Peptonlösung 0,6/4,0	s, v
YOSHII-Peptonlösung 0,6/0,6	f
YOSHII-Peptonlösung 0,1/4,0	f, s, v
YOSHII-Peptonlösung 0,1/0,6	s, v

Die gute Wirkung von 2% igem Kart.-Dekokt auf *Podangium* bestätigt den Befund OETKERS (1953).

Fruchtkörper traten auf in:

<i>Coli</i> -Suspension (Konzentration s. o.)	f
Kart.-Wasser (2%)	f, s, v
NORÉN III-Lösung	f
<i>Daucus</i> -Lösung (YOSHII 1926, 5%)	f
Kart.-Lösung (YOSHII 1926, 5%)	f
YOSHII-Peptonlösung 0,1/0,6	f

Mehrere Passagen ließen sich jedoch bisher in keiner Flüssigkeitskultur erzielen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die einzelnen Futtergaben die Fruktifikation der Myxobakterien in verschiedener Weise beeinflussten. In vielen Fällen, besonders bei dem stets leicht fruktifizierenden *fulvus*, wurde eine Entwicklung bis zur Fruchtkörperausbildung erzielt.

C. Fruktifikationsphysiologische Untersuchungen

Aus den bisherigen Darlegungen kann geschlossen werden, daß zwar eine Förderung bzw. Hemmung der Fruktifikation durch die Futterquelle möglich ist, daß die Bildung der Fruchtkörper aber nicht wesentlich durch Substrateinflüsse zustande kommt, sondern durch endogene Faktoren. Von den Fruchtkörpern selbst scheint ein Reiz auszugehen, durch den die vegetativen Stadien zur Bildung neuer Fruchtkörper veranlaßt werden. Diese Beeinflussung dürfte chemischer Natur sein. Es wurde deshalb versucht, eine Bildungssubstanz in den Fruchtkörpern selbst nachzuweisen, und zwar mit Hilfe verschiedener indirekter Methoden, bei denen die Zunahme der Fruktifikationsintensität gemessen wurde.

1. Durch Aufimpfung eines Kreises bzw. Halbkreises von Fruchtkörpern um einen gleichzeitig aufgeimpften einzelnen Fruchtkörper herum (oder Aufimpfung zweier einander gegenüberliegender Fruchtkörper im Abstand von 2 cm) auf noch unbewachsenen Agar wurden weder der innere noch die äußeren Fruchtkörper gefördert; die weitere Fruktifikation verlief völlig normal, irgendeine Beschleunigung bei der Bildung neuer Fruchtkörper trat nicht auf. Die Durchmesser der lysierten Zonen hatten stets denselben Mittelwert wie die der Kontrolle. Wenn bei diesen Versuchen zwischen zwei Fruchtkörper ein Stückchen eines sterilen Deckglases eingesetzt wurde, änderte sich das Ergebnis dadurch nicht. — In anderen Versuchen mit 2 Fruchtkörpern wurde der zweite Fruchtkörper nicht gleichzeitig mit dem ersten, sondern erst nach 10 Tagen

aufgeimpft. Der später eingesetzte wurde nun vom ersten derart gefördert, daß er ihn in der Größe des Lysiszonendurchmessers sogar einige Male überholte, in bezug auf die Fruktifikationsintensität der bei der 2. Revision neu gebildeten Fruchtkörper jedoch immer. Diese Tatsache erscheint verständlich, wenn die Myxobakterienfruchtkörper innerhalb von 10 Tagen eine Substanz bilden, die die Entstehung neuer Fruchtkörper fördert. Bei gleichzeitiger Einimpfung ist diese Substanz offenbar zunächst noch nicht vorhanden, so daß keine Förderung der Fruktifikation auftritt.

Während auf reinem Agar die ersten Fruchtkörper 10 Tage vor den zweiten Fruchtkörpern eingesetzt werden mußten, genügten dafür bei Kart.-Coli-Weiz.-Agar schon 1—5 Tage. Auf dem nährstoffreichen Agar ergaben mehrfach wiederholte Versuche das Optimum der Förderung von *fulvus* durch die am 1., 2. und 3. Tage nach Ausgießen des Agars (1/5, 2/5, 3/5) eingesetzten ersten Fruchtkörper. Tab. 7 gibt hierzu aus 12 Parallelen die Prozente der Mittelwerte der Lysiszonendurchmesser an.

Tabelle 7. *Myxococcus fulvus*. Einfluß zeitlich verschiedener Impfungen auf die Lysiszonendurchmesser in Prozent der Zunahme der Lysiszonendurchmesser

zeitliche Impfabstände der beiden Fruchtkörper	5/5 ¹	4/5	3/5	2/5	1/5	0/5
Lysiszonen in Prozent	100	±0	+12,5	+2,5	+20	—1,25

¹ Erste Zahl: Impftermin für den ersten Fruchtkörper, zweite Zahl: Impftermin für den zweiten Fruchtkörper in Tagen nach Ausgießen des Agars.

Da hier stets ausgebildete Fruchtkörper vorlagen, konnte die Fruktifikationsintensität nur nach dem Größerwerden des Lysiszonendurchmessers beurteilt werden. Die Anzahl der Fruchtkörper hingegen sagt nichts über die Förderung bzw. Hemmung aus (vgl. Autolyse im methodischen Teil). Das gilt für alle Versuche dieses Abschnittes.

Die jeweils nach 5 Tagen in die Schalen eingesetzten zweiten Fruchtkörper keimten aus und bildeten in 10 Tagen wieder gut ausdifferenzierte Fruchtkörper, während aus den zuerst geimpften Fruchtkörpern nur Anlagen entstanden.

Der Einfluß von *fulvus* auf *fulvus* wurde innerhalb von 5 Tagen untersucht und dabei eine Entwicklungsförderung festgestellt, wenn der erste Fruchtkörper 2—4 Tage vor dem zweiten Fruchtkörper eingesetzt wurde. Bei *stipitatus* und bei Kombinationen von *fulvus* mit *stipitatus* wurde nur mit den Stadien 4/5, 3/5 und 0/5 gearbeitet.

Der Einfluß von *stipitatus* auf *stipitatus* erreichte bei 4/5 bis 15% (Abb. 3), bei 3/5 bis 30% und bei 0/5 bis 16% Förderung.

Fulvus förderte *stipitatus* bei 3/5 und 0/5 (Abb. 4) bis zu rund 30%, wirkte aber bei 4/5 bis zu 25% hemmend.

Stipitatus hatte auf *fulvus* bei 4/5, 3/5 (Abb. 5) und 0/5 hemmenden Einfluß, und zwar bei 4/5 bis 6%, bei 3/5 bis 6,5% und bei 0/5 bis 15%.

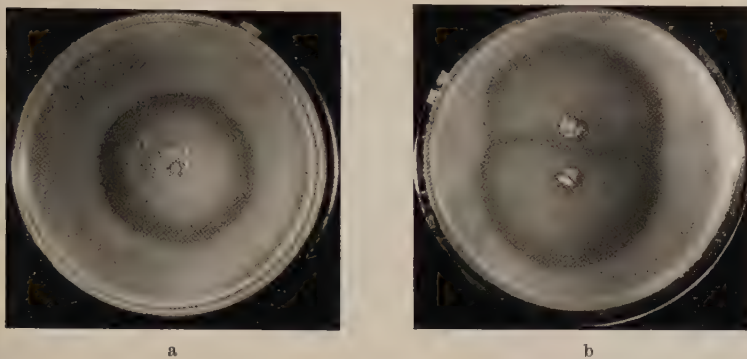


Abb. 3. a *Myxococcus stipitatus*. b Kombination *stipit./stipit.*; Förderung des Lysiszonendurchmessers von *My. stipitatus* (unten) durch *My. stipitatus* (oben) auf Kart.-Coli-Weiz.-Agar bei 4/5. 0,5mal

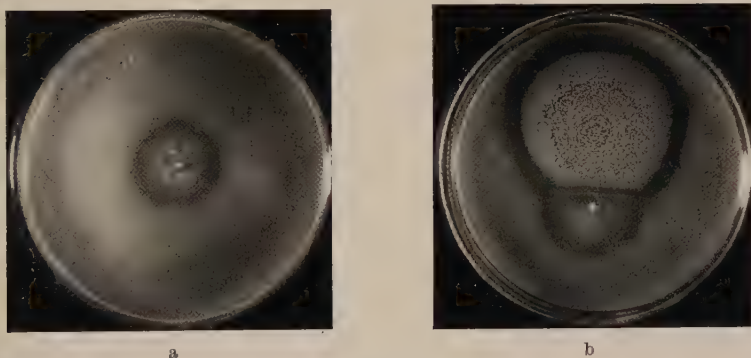


Abb. 4. a *Myxococcus stipitatus*. b Kombination *fulvus/stipit.*; Förderung des Lysiszonendurchmessers von *My. stipitatus* (unten) durch *My. fulvus* (oben) auf Kart.-Coli-Weiz.-Agar bei 0/5. 0,5mal

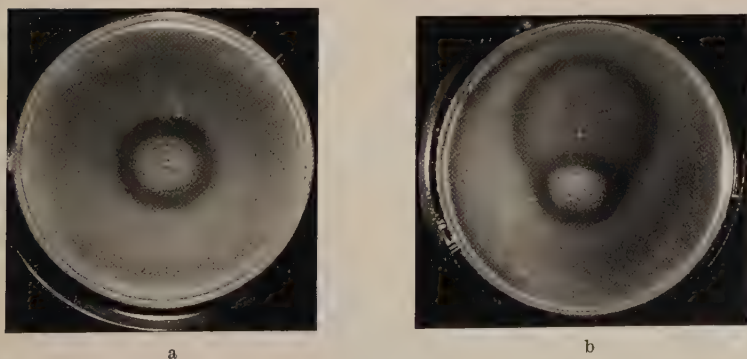


Abb. 5. a *Myxococcus fulvus*. b Kombination *stipit./fulvus.*; Hemmung des Lysiszonendurchmessers von *My. fulvus* (unten) durch *My. stipitatus* (oben) auf Kart.-Coli-Weiz.-Agar bei 3/5. 0,5 mal

Das Ergebnis (siehe Tab. 8, erste Methode. Die weiteren Erklärungen zur Tabelle folgen jeweils bei Besprechung der Methoden) war also in jedem Falle eine Förderung der eignen Art. Durch *stipitatus* wurde *fulvus* gehemmt, während *fulvus* den Partner *stipitatus* förderte.

2. Danach wurde angestrebt, die Beeinflussung der Fruktifikationsintensität auf der Agaroberfläche fortzusetzen. Und zwar sollte die Diffusion der Fruchtkörpersubstanz durch Cellophanmembranen ($2,6 \cdot 2,6$ cm)¹, Cellophanringe (\varnothing 2,0 cm, Höhe 0,8 cm)¹, durch Celluloseester-Membranfilter (\varnothing 3,1 cm)², Filtrierpapier (Rundfilter mit \varnothing 4,0 cm), Acetatrohfilm ($3,0 \cdot 3,0$ cm) und durch Agarauflagen ($2,2 \cdot 2,2$ cm) untersucht werden.

Die Höhe der Agarauflagen wurde standardisiert durch Eingießen von 20 cm³ Nähragar in Petrischalen von 8,8 cm Bodendurchmesser; aus diesen Agarplatten wurden mit einem Nickelspatel die Aufлагestücke herausgeschnitten.

Zur Beobachtung einer Aufwärtsdiffusion wurden die Versuchsplatten mit Einzelfruchtkörpern beimpft. Nach 3 Tagen wurde jeder Fruchtkörper mit einer Membran bedeckt und diese wiederum mit einem einzelnen Fruchtkörper beimpft, dessen Weiterentwicklung unter dem Einfluß der durch die Membran diffundierenden Substanzen beobachtet werden sollte. Zur Kontrolle wurden Platten verglichen, die unter der Membran keinen Fruchtkörper enthielten.

In umgekehrter Diffusionsrichtung lagen die Membranen auf dem unbeimpften Agar, wurden mit einem Fruchtkörper beimpft und nach 3 Tagen entfernt. An ihre Stelle wurden neue Einzelfruchtkörper auf den Agar gesetzt, deren Entwicklung mit derjenigen von Kontrollfruchtkörpern verglichen wurde. Diese Kontrollfruchtkörper wuchsen auf Platten, die zwar 3 Tage lang mit Membranen bebrütet waren, aber ohne Fruchtkörper auf den Membranen.

Selbstverständlich mußte mit den verschiedensten Ergebnissen gerechnet werden auf Grund der Unterschiedlichkeit des Membranmaterials, ganz besonders aber bei einer Diffusion von unten nach oben, da in diesem Falle die Myxobakterien direkt auf der Membran wachsen und fruktifizieren mußten. Ein Optimum an Zeit für die Diffusion der Fruchtkörperstoffe von unten nach oben ließ sich nicht genau bestimmen. Es schwankte bei Membranfiltern zwischen 5 und 12 Tagen, bei Agarauflagen um etwa 3 Tage.

Mit Cellophanmembranen (Tab. 8) ergab sich für den Einfluß von *fulvus* auf *fulvus* bei Abwärtsdiffusion eine Förderung. Die Hemmung bei Aufwärtsdiffusion ist durch die schlechte Wachstumsmöglichkeit auf der Membran selbst zu erklären.

Um Aufschlüsse über die eventuelle Artspezifität der Substanz zu gewinnen, wurden Versuche mit zwei verschiedenen Myxobakterienarten angesetzt, und zwar mit *fulvus* und *virescens* in abwärtsführender Diffusion. Dabei mußten zwei verschiedene Nährsubstrate verwandt werden, nämlich neben Kart.-*Coli*-Weiz.- auch Dextr.-Hefe-Weiz.-Agar, um *virescens* die entsprechende optimale Wachstumsmöglichkeit zu bieten. Die Kombination *fulvus*/*fulvus* (der zuerst genannte, obere Organismus wurde

¹ Dialysierschlauch von Kalle, Wiesbaden.

² Membranfilter-Gesellschaft, Göttingen.

stets 3 Tage vor dem zweitgenannten, unteren, eingesetzt) führte sowohl auf Kart.-*Coli*-Weiz.-Agar wie auf Dextr.-Hefe-Weiz.-Agar zur Förderung der unteren Fruchtkörper; ebenfalls wurde *virescens* durch *virescens* auf beiden Medien angeregt. Bei der Zusammenstellung *virescens/fulvus*

Tabelle 8. Förderung (+) bzw. Hemmung (—) der Fruktifikation bei den verschiedenen Kombinationen¹ von Myxobakterienarten nach 4 Methoden
Substrat: Kart.-*Coli*-Agar, in Klammern Dextr.-Hefe-Agar. Der Pfeil weist jeweils auf den beeinflussten Organismus hin. *f* = *Myxococcus fulvus*, *s* = *My. stipitatus*, *v* = *My. virescens*, *P* = *Podangium erectum*

Myxobakterien-Kombinationen	1. Methode: Fruchtkörper auf dem Agar	2. Methode: Membranversuche mit										3. Methode: Filtrat-Zusatzagar	4. Methode: Fruchtkörper-Zusatzagar		
		Cellophan- membranen	Cellophan- ringen	Membran- filtern	Filterpapier	Acetat- rohfilm	Agarauflagen	Diffusionsrichtung							
								$o \rightarrow u^2$	$u \rightarrow o$	s^3	$o \rightarrow u$			$u \rightarrow o$	$o \rightarrow u$
$f \rightarrow f$	+	+(+)	—	+	—	—	—	0	0	+	—	+(+)			
$s \rightarrow f$	—			+	0				0	0	+	—	+		
$v \rightarrow f$		+(—)		+							—	—	—(—)		
$P \rightarrow f$											—	—			
$s \rightarrow s$	+			+							—	—	+		
$f \rightarrow s$	+			+							0	—	+		
$v \rightarrow s$				+							—	—			
$P \rightarrow s$											—	—			
$v \rightarrow v$		+(+)		+(+)							—	—	+(+)		
$f \rightarrow v$		+(—)		—(+)							—	—	+(+)		
$s \rightarrow v$											—	—			
$P \rightarrow v$											—	—			
$P \rightarrow P$											+		+		
$f \rightarrow P$											0				
$s \rightarrow P$											—				
$v \rightarrow P$											—				

¹ Die nicht untersuchten Kombinationen (siehe fehlende Tabellenwerte) müssen späteren Arbeiten vorbehalten bleiben. Die Vervollständigung wäre zeitlich über den Rahmen dieser Arbeit hinausgegangen.

² o = oben, u = unten.

³ s = seitlich.

trat *fulvus*-Förderung nur auf Kart.-*Coli*-Weiz.-Agar ein, auf Dextr.-Hefe-Weiz.-Agar hingegen geringfügige Hemmung. Im umgekehrten Falle, also *fulvus/virescens*, förderte *fulvus* die *virescens*-Fruchtkörper nur auf Kart.-*Coli*-Weiz.-Agar, hemmte sie dagegen etwas auf Dextr.-Hefe-Weiz.-Agar.

Kart.-Coli-Weiz.-Agar verhalf also in jedem Falle zur Förderung, Dextr.-Hefe-Weiz.-Agar nur bei Zusammenstellung von Fruchtkörpern derselben Art.

Außerdem wurden aus dem Material der Cellophanmembranen, dem Dialysierschlauch, Ringe von 8 mm Höhe (\varnothing 2 cm) geschnitten und senkrecht in den Agar gesetzt, um den Diffusionseinfluß auch in waagerechter Richtung zu untersuchen. Um den Cellophanringen größere Formfestigkeit zu geben, wurden sie über Halbringe aus Glas gezogen. Die diffundierende Substanz konnte dann nur durch die straff gezogene Cellophanwand dringen, die den Durchmesser des Glasringes darstellt. In den Mittelpunkt der Halbringe kam ein Fruchtkörper der einen Art, außerhalb der Ringe wurde nach Ablauf von 3 Tagen jeweils ein Fruchtkörper derselben oder einer anderen Art eingesetzt, und zwar in 1 cm Abstand vom zuerst eingesetzten Fruchtkörper. Bei diesen Versuchsreihen (Tab. 8) wurde *fulvus*_{außen} von *fulvus*_{innen}, *stipitatus*_{innen} und *virescens*_{innen} gefördert. *Stipitatus*_{außen} erhielt ebenfalls Anregung durch *fulvus*_{innen}, *stipitatus*_{innen} und *virescens*_{innen}; desgleichen *virescens*_{außen} auf Dextr.-Hefe-Weiz.-Agar durch *fulvus*_{innen} und *virescens*_{innen}. Auf Kart.-Coli-Weiz.-Agar machte sich durch *fulvus*_{innen} eine geringe Hemmung der Fruktifikation bemerkbar, während *virescens*_{innen} auch auf diesem Nährboden förderte.

Ein Versuch mit Membranfiltern (Tab. 8) ergab für die Abwärtsdiffusion eine überwiegende Hemmung von *fulvus* durch *fulvus*. Wenn mit dem Abnehmen der Membranen 6 Tage gewartet wurde, trat weder Hemmung noch Förderung ein. — Die aufwärtsdiffundierende Substanz hemmte *fulvus* ebenfalls. — Bei einem Parallelversuch mit abgetötetem *fulvus*-Material fiel die Hemmung weg, aber ohne daß eine Förderung an ihre Stelle getreten wäre. — Um die Kombination von *fulvus* und *stipitatus* zu prüfen, wurde eine entsprechende Versuchsreihe mit Abwärtsdiffusion aufgestellt. *Fulvus* zeigte jedoch keinerlei Förderung oder Hemmung.

Mit Filtrierpapier als Diffusionsmembranen (Tab. 8) wurde nur der Einfluß von *fulvus* auf *fulvus* untersucht. Sowohl bei Abwärts- wie bei Aufwärtsdiffusion trat Hemmung der Fruktifikationsintensität und des Lysiszonendurchmessers auf. Die Papiere wurden außer auf Agar auch auf NORÉN III-Lösung gelegt und dort die Aufwärtsdiffusion der fruchtkörperhaltigen Lösung untersucht. Auch hierbei ergab *fulvus* Hemmung.

Als für die Membranen dichteres Material, nämlich Acetatrohlfilm (Tab. 8), gewählt wurde, kam weder bei abwärts- noch bei aufwärtsgerichteter Diffusion ein meßbarer Einfluß zustande. Auch durch *stipitatus* ließ sich *fulvus* weder anregen noch hemmen.

Um auch Agaraufgaben (Tab. 8) als Diffusionsmembranen zu prüfen, wurden Kulturen mit 4 Fruchtkörpern beschickt und auf diese nach

3 Tagen Wartezeit die Agarstücke gelegt. Jede Agarauflage wurde sofort mit einem Fruchtkörper beimpft. Als Kontrollen dienten Schalen, bei denen sich unter den Agarauflagen keine Fruchtkörper befanden. Die Versuche wurden nur mit *fulvus* und *stipitatus* durchgeführt. Fruktifikationsgrad und Lysiszonendurchmesser von *fulvus* erhielten Anregung sowohl durch *fulvus* wie durch *stipitatus*, während *stipitatus* sich selbst hemmte und auf *fulvus* nicht eindeutig reagierte.

Aus den Befunden der Membranversuche ist zu schließen, daß die Cellophan- und Agarmembranen für das Fruktifikationsstimulans durchlässig sind und daß die eigne Art vorwiegend gefördert wird.

3. In einer weiteren Versuchsgruppe wurde mit Filtraten aus Flüssigkeitskulturen gearbeitet. Dazu wurde dem Agar direkt ein Filtrat zugesetzt, das aus einer mit Myxobakterien bewachsenen Nährlösung gewonnen und zum Teil mit Hilfe der Vacuumdestillation eingengt worden war.

Die Vorzucht der Myxobakterien zur Filtratgewinnung erfolgte in 100 cm³-Erlenmeyerkolben mit je 50 cm³ NORÉN III-Lösung (NORÉN 1952a) bei 25° C im dunklen Thermostaten. Die filtrierte Lösung wurde in verschiedenen Konzentrationen mit Hilfe von Zentrifuge und Membranfiltern steril filtriert und direkt aus den sterilen Zentrifugenbechern mittels einer sterilisierten Pipette in die Petrischalen gefüllt, der Agar möglichst kühl darübergegossen und auf gute Vermischung geachtet. Als Kontrolle dienten Schalen mit Zusatz von reiner NORÉN III-Lösung in den entsprechenden Konzentrationen.

Für die Versuche wurde Filtrat 10 Tage alter Flüssigkeitskulturen benutzt. Zwischen den Einengungstemperaturen 20° und 40° C war kein Unterschied festzustellen im Hinblick auf die spätere Wirkung bei 2facher Konzentration. — Das Verhältnis der zugesetzten Menge des Filtrats betrug 0—5 cm³ zu 15 cm³ Agar. Dem Nähragar wurden entweder 0 cm³ Filtrat + 5 cm³ NORÉN III-Lösung (als Kontrolle), 1 cm³ Filtrat + 4 cm³ NORÉN III-Lösung oder 5 cm³ Filtrat + 0 cm³ NORÉN III-Lösung zugesetzt. Das ergab die folgenden Fruchtkörperintensitäten von *fulvus* bzw. *stipitatus* auf *fulvus*-Filtrat nach 15 Tagen (Tab. 9).

Bei Gegenüberstellung der 2-, 4-, 6-, 8-, 10-, 16- und 20fachen Konzentrationen des Filtrates ergaben sich keine bemerkenswerten Unterschiede. 20fache Konzentration bewirkte allerdings einen schwachen Abfall der Entwicklung von *stipitatus* auf reinem Agar + 1 cm³ *fulvus*-Filtratzusatz gegenüber 4facher Konzentration (nur Anlagenbildung statt Anlagen- und Fruchtkörperbildung nach 15 Tagen).

Bei 2facher Konzentration, also Einengung auf die Hälfte, wurden alle 4 Myxobakterien auf allen 4 Myxobakterienfiltraten untersucht. Die

Tabelle 9. *Myxococcus fulvus* und *My. stipitatus*. Einfluß des 2fach konzentrierten *fulvus*-Filtrats auf die Fruktifikation bei verschiedenen Zusatzmengen (Mittelwerte von je 20 Parallelen). Die Zahlen geben den Grad der Fruchtkörperbildung an

<i>fulvus</i> Filtrat in cm ³	<i>Myxococcus</i> <i>fulvus</i>	<i>Myxococcus</i> <i>stipitat.</i>
0	1	3—2
1	2—1	3—2
5	3—2	3—2

einzelnen Fruchtkörper wurden auf Nähragar geimpft, dem je Schale 2 cm³ Filtrat zugesetzt worden war, der Kontrolle entsprechend reine NORÉN III-Lösung. Wider Erwarten förderte nicht immer die eigene Art, so daß später eine natürlichere Methode als dieser künstliche Filtratzusatz gewählt wurde (vgl. Kapitel C. 4). — *Fulvus* wuchs weder auf *fulvus*- noch auf *stipitatus*-Filtratzusatz, auf *virescens*-Zusatz nur vegetativ und auf *Podangium* mit Fruchtkörpern, die kleiner als bei der Kontrolle blieben (Tab. 8). Die Entwicklung von *stipitatus* blieb auf allen Filtratzusätzen zurück, desgleichen die Fruktifikation von *virescens*. Nur für *Podangium* ergab sich eine Förderung durch das eigne Filtrat bis zur Bildung von Fruchtkörperanlagen und auch auf *fulvus*-Filtrat keine Hemmung; auf *stipitatus* und *virescens* blieb das Wachstum etwas zurück.

Als Grund für die Hemmung der Fruktifikation durch die Filtratzusätze kann man wohl eine Giftwirkung der in großer Menge in die Nährlösung ausgeschiedenen Fruchtkörperstoffe und Stoffwechselprodukte, vielleicht auch eine Giftwirkung durch die konzentrierte Caseinhydratlösung annehmen.

4. Mit einer direkteren Methode, die etwa der der Fruchtkörperbeeinflussung auf dem Agar entspricht, sollten weitere Ergebnisse erzielt werden. Zu diesem Zweck wurde statt des Filtrats eine bestimmte Menge abgekratzter Fruchtkörper auf Agar geimpft und nach bestimmter Zeit durch Autoklavieren abgetötet. Anschließend wurde der Fruchtkörper-Agar dekantiert und nach der Sterilisation in Petrischalen ausgegossen. Auf diese Platten wurden je 4 Fruchtkörper gesetzt und beobachtet. Wenn die Fruchtkörper auf dem Agar sofort getötet wurden, machte sich kaum ein Einfluß bemerkbar, so daß die Zeit getestet werden mußte, in der die Fruchtkörper eine genügende Menge ihrer Substanz ausgeschieden hatten. 3 Tage Wartezeit bis zur Abtötung der aus einer 10 Tage alten Kultur stammenden Zusatz-Fruchtkörper erwiesen sich als optimal für die fördernde Wirkung von *fulvus*-Agar, 5 Tage für diejenige von *stipitatus*-Agar auf *fulvus*-Fruchtkörper und 9 Tage für diejenige von *stipitatus*-Agar auf *stipitatus*-Fruchtkörper.

Für die oben genannte 3tägige Diffusionszeit für *fulvus*-Agar war der Inhalt von 3 Schalen *fulvus*/100 cm³ Nähragar zugrunde gelegt worden. Wenn die Zusatzfruchtkörper nicht erst nach 3 Tagen, sondern sofort abgetötet wurden, war der Inhalt von mindestens 5 Schalen/100 cm³ Nähragar nötig, um eine Wirkung zu erzielen.

Für die Messung der optimalen Menge des Zusatzes wurde die Einwirkungszeit von 3 Tagen für *fulvus* zugrunde gelegt. Das Maximum lag bei einem Zusatz von Fruchtkörpern aus 8—16 Schalen *fulvus*, und zwar ergab der Zusatz des Inhalts von 8 Schalen/100 cm³ den größten Lysisonendurchmesser. Bei 24 Schalen Zusatz trat bereits Hemmung von *fulvus* ein, bei 32 Schalen Zusatz war kaum noch Wachstum festzustellen.

Da bei der Kombination mit *virescens* (s. u.) auch Dextr.-Hefe-Agar für *fulvus* benutzt wurde, können über den Einfluß von *fulvus* auf *fulvus* auf diesem Substrat Aussagen gemacht werden (Tab. 8): Bei Zusatz von 10 Schalen *fulvus*-Inhalt/100 cm³ Dextr.-Hefe-Agar trat deutliche Förderung auf. So gut wie auf dem gebräuchlichen Nähragar wuchs *fulvus* allerdings hierauf nicht.

Wenn *stipitatus* auf *fulvus*-Agar geimpft wurde, ergab sich eine vorwiegende Förderung der Fruktifikationsintensität, die bis zur völligen Fruchtkörperausbildung fortschritt (bei 20, 24 und 28 Schalen *fulvus*-Zusatz). Der Durchmesser der Lysiszone war dagegen meist etwas gehemmt.

Bei Beimpfung des *fulvus*-Agars mit *virescens* mußte die Möglichkeit schlechter Ergebnisse mit einbezogen werden, da *virescens* ja auf Kart.-*Coli*-Agar schlecht gedeiht. Auch Versuche auf Dextr.-Hefe-*fulvus*-Agar wurden zum Vergleich herangezogen. Aus beiden Beobachtungsreihen ging eine deutliche Förderung von *virescens* hervor, auf Kart.-*Coli-fulvus*-Agar sogar eine Fruktifikationsgradsteigerung neben der Erweiterung des Lysiszonendurchmessers.

Wenn ein *stipitatus*-Agar mit *fulvus* bzw. *stipitatus* beimpft wurde, förderte die eigne Art sich selbst (bei 4, 8, 12, 16 Schalen *stipitatus*-Zusatz), und auch *fulvus* erfuhr eine Vergrößerung des Lysiszonendurchmessers, insbesondere bei 12 Schalen *stipitatus*-Zusatz.

Bei Aufimpfung von *virescens* auf *virescens*-Zusatzagar ergab sich auf Dextr.-Hefe-*virescens*-Agar eine erhebliche Förderung bei Zusatz von 3, 9 und 15 Schalen (bis 29%), auf Kart.-*Coli-virescens*-Agar bei Zusatz von 7 Schalen *virescens*-Material eine Förderung bis zu 20%. — Bei Aufimpfung von *fulvus* auf Kart.-*Coli-virescens*- bzw. Dextr.-Hefe-*virescens*-Agar trat Hemmung ein (vgl. Cellophanmembranen auf Dextr.-Hefe-Agar).

Aus den obigen Versuchen ergibt sich, daß alle untersuchten Myxococcaceen durch Kombination mit der eignen Art eine Steigerung der Fruktifikation erfahren. Auch bei der Untersuchung der Gattung *Podangium* ergab sich eine Förderung; bei 3 Schalen Zusatz wurde der Lysiszonendurchmesser vergrößert. Bei Zugabe von 9, 15 und 20 Zusatzschalen trat jedoch schon Hemmung ein.

Hieraus ist zu schließen, daß die Substanzen, die in den Nähragar diffundieren, ihre Wirkung trotz Erhitzung auf 120° C je nach Diffusionszeit und Zusatzmenge positiv oder negativ entfalten. Wie aus der obigen Darlegung hervorgeht, wirkte lediglich *virescens* auf *fulvus* hemmend. Das mag auf die benutzte Zusatzmenge zurückzuführen sein.

Schon FINCK (1950) und KÜHLWEIN (1955) berichten, daß sich besonders bei *virescens* stets Schwierigkeiten bei Reinkulturen ergeben. Oft hört die Fruktifikation ohne ersichtlichen Grund auf; es kommt höchstens

zur Anlagenbildung. Um die Wirkung dieser Anlagen zu untersuchen, wurde eine bestimmte Menge abgekratzter Fruchtkörperanlagen auf Agar geimpft und nach bestimmter Zeit wie bei den Versuchen mit Fruchtkörper-Zusatzagar durch Autoklavieren abgetötet. Die Versuche wurden mit Zugabe des Inhalts von 6 Schalen *fulvus* bzw. *virescens* je 100 cm³ Nähragar durchgeführt. Es stellte sich heraus, daß eine 3 tägige Diffusionszeit bei Anlagenzusatz ohne Wirkung bleibt. Zwischen Anlagen- und Fruchtkörperzusatz ergab sich bei *fulvus* ein deutlicher Unterschied, der besonders als Förderung des Lysiszonendurchmessers durch Fruchtkörperzusatz wirksam wurde. Für *virescens* war der Einfluß nicht meßbar.

5. Es schien nun untersuchenswert, ob die Förderung von *fulvus* durch *fulvus* auch in Erscheinung tritt, wenn Algen auf einem Fruchtkörper-Zusatzagar verfüttert werden. Hierzu wurden 16 Grünalgenstämme ausgewählt. Die hier unter *Volvocales* aufgeführten Grünalgen werden in den Tab. 11 und 12 V 1—V 2, die *Chlorococcales* C 1—C 9 und die *Ulotrichales* U 1—U 6 bezeichnet.

Volvocales:

V 1 *Chlamydomonas eugametos* ♀. 11/5c¹ C 8 *Scenedesmus obliquus* . . . 276/3a

V 2 *Chlamydomonas eugametos* ♂. 11/5d C 9 *Scenedesmus quadricauda* . . . 276/4a

Chlorococcales:

C 1 *Chlorella pyrenoidosa* . . . 211/8b U 1 *Hormidium barlowi* . . . 335/1a

C 2 *Coelastrum proboscideum* . . . 217/3 U 2 *Hormidium flaccidum* . . . 335/2a

C 3 *Crucigenia apiculata* . . . 218/1 U 3 *Hormidium nitens* . . . 335/3

C 4 *Protosiphon botryoides* . . . 231/1a U 4 *Stichococcus bacillaris* . . . 379/1a

C 5 *Pediastrum tetras* . . . 261/5 U 5 *Stichococcus chloranthus* . . . 379/2

C 6 *Pediastrum biradiatum* . . . 261/1 U 6 *Stichococcus mirabilis* . . . 379/3

C 7 *Scenedesmus naegelii* . . . 276/2

Ulotrichales:

Die 4 Wochen lang in natürlichem Licht-Dunkel-Wechsel vorgezogenen Algen kamen zu je 4 Ausstrichparallelen/Petrischale (Abb. 1 u. S. 193 oberer Text) in einer Versuchsreihe auf Nähragar, in einer andern auf *fulvus*-Agar. Auf die Grünalgen-Ausstriche wurden Myxobakterien-Fruchtkörper geimpft und die Schalen bei natürlichem Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten, um einen Vergleich mit gleichzeitig angesetzten Algen- und Algen-*fulvus* bzw. Algen-*stipitatus*-Schalen zu bekommen. Bei der Herstellung der benutzten Nährböden wurde jeweils der Inhalt von 4 Myxobakterienschalen als Zusatz zu 100 cm³ Nähragar gegeben. Bis zur Abtötung der Fruchtkörperbeigaben genügte jeweils eine Diffusionszeit von 3 Tagen.

Bei einem Vorversuch mit V 2 (Tab. 10) ergab sich auf Kart.-Coli-Agar eine leichte Hemmung der Lysiszone (der Kontrolle ohne Algen gegenüber), während auf *fulvus*-Agar eine Förderung nach 6 Tagen bemerkbar wurde. Der Versuch wurde täglich protokolliert. Die Algen gediehen auf dem *fulvus*-Agar schlechter als auf Algen-Agar, wie ein Kontrollversuch ergab.

¹ Bezifferung der Pringsheimschen Algensammlung im Pflanzenphysiologischen Institut in Göttingen.

Ein größerer Versuch mit allen übrigen Algen lieferte folgende Ergebnisse (Tab. 11): Auf Nähragar trat außer durch *C 1* Hemmung des Lysiszonendurchmessers von *fulvus* ein. Aber auch *fulvus*-Agar + Algen + *fulvus* brachte keine Vergrößerung des Durchmessers. Nur der Fruktifikationsgrad erfuhr durch *V 1*, *C 3*, *C 4* und *U 4* eine Steigerung, so daß sich auf den genannten Grünalgen alle Anlagen zu Fruchtkörpern ausbilden konnten.

Tabelle 10. *Myxococcus fulvus*. Beeinflussung des Fruktifikationsgrades bzw. des Lysiszonendurchmessers (eingeklammert) durch *V 2* auf Kart.-Coli- bzw. Kart.-Coli-*fulvus*-Agar¹. Kontrolle = *fulvus* auf Kart.-Coli- bzw. Kart.-Coli-*fulvus*-Agar ohne *V 2*

	Kart.-Coli-Agar	Kontrolle	Kart.-Coli- <i>fulvus</i> -Agar	Kontrolle
1. Revision	2 (1,2)	2 (1,5)	2 (1,7)	2 (1,7)
2. Revision	2—1 (2,5)	2—1 (2,5)	2—1 (2,6)	2—1 (2,7)
3. Revision	2—1 (3,0)	2—1 (3,3)	2—1 (3,4)	2—1 (3,4)
4. Revision	1 (3,4)	1 (3,7)	1 (3,6)	1 (3,6)
5. Revision	1 (3,9)	1 (4,1)	1 (4,0)	1 (4,0)
6. Revision	1 (4,2)	1 (4,5)	1 (4,3)	1 (4,1)

Tabelle 11. *Myxococcus fulvus*. Beeinflussung des Fruktifikationsgrades bzw. des Lysiszonendurchmessers (in Klammern) durch verschiedene Grünalgen auf Kart.-Coli- bzw. Kart.-Coli-*fulvus*-Agar¹.

Alge	Kart.-Coli-Agar	Kart.-Coli- <i>fulvus</i> -Agar	Alge	Kart. Coli-Agar	Kart.-Coli- <i>fulvus</i> -Agar
<i>V 1</i>	2—1 (2,7)	1 (3,0)	<i>U 1</i>	2—1 (2,8)	2—1 (2,8)
<i>C 1</i>	2—1 (3,4)	2—1 (3,0)	<i>U 2</i>	2—1 (3,0)	2—1 (2,6)
<i>C 2</i>	2—1 (3,3)	2—1 (3,3)	<i>U 3</i>	2—1 (2,4)	2—1 (3,0)
<i>C 3</i>	2—1 (2,8)	1 (3,2)	<i>U 4</i>		1 (3,1)
<i>C 4</i>	2—1 (3,0)	1 (3,2)	<i>U 5</i>		2—1 (3,3)
<i>C 5</i>	2—1 (3,0)	2—1 (3,2)	<i>U 6</i>	2—1 (3,0)	2—1 (3,0)
<i>C 6</i>	1 (3,1)	2—1 (3,1)	Ko	2—1 (3,3)	2—1 (3,4)
<i>C 7</i>	2—1 (2,8)	2—1 (2,6)			
<i>C 8</i>	2—1 (2,8)	2—1 (2,7)			
<i>C 9</i>	2—1 (3,0)	2—1 (2,6)			

¹ Der Zusatz-Agar wurde durch Zugabe von 4 *fulvus*-Schalen/100 cm³ Nähragar hergestellt.

In einer anderen Beobachtungsreihe wurde *fulvus* auf Algenausstriche auf *stipitatus*-Agar geimpft (Tab. 12). Es ergab sich wieder eine Hemmung auf Nähragar ohne Zusatz (nur *C 4* und *C 5* förderten den Lysiszonendurchmesser leicht). Auf *stipitatus*-Agar fand dagegen Förderung des Durchmessers von *fulvus* gegenüber der Kontrolle durch *C 1*, *C 2*, *C 4*, *C 5* und *U 5* statt. Gegenüber Nähragar wirkten auf *stipitatus*-Agar *V 1*, *C 1*, *C 2*, *C 7*, *C 8*, *C 9*, *U 1*, *U 2*, *U 5* und *U 6* fördernd auf *fulvus*. Dieses Ergebnis entspricht der Förderung bei der *stipitatus-fulvus*-Kombination der normalen Fruchtkörper-Zusatz-Versuche (Kapitel C. 4).

Eine Parallelreihe wurde unter denselben Bedingungen mit *stipitatus* beimpft. Im Vergleich zur Kontrolle förderten auf Nähragar *C 4*, *C 7*, *C 8*, *C 9*, *U 1* und *U 2*, auf *stipitatus*-Agar nur *U 2*, *U 3* und *U 4*. Gegenüber Nähragar war also *stipitatus*-Agar ein hemmender Faktor für den Durchmesser der Lysiszone von *stipitatus* (im Gegensatz zur Kombination *stipitatus/stipitatus* der normalen Fruchtkörper-Zusatz-Versuche in Teil C. 4).

Tabelle 12. *Myxococcus fulvus* und *My. stipitatus*. Beeinflussung des Fruktifikationsgrades bzw. des Lysiszonendurchmessers (eingeklammert) durch verschiedene Grünalgen auf Kart.-Coli- bzw. Kart.-Coli-*stipitatus*-Agar¹

Alge	Kart.-Coli-A. + <i>M. fulvus</i>	Kart.-Coli- <i>stipitatus</i> -A. + <i>M. fulvus</i>	Kart. Coli-A. + <i>M. stipitatus</i>	Kart.-Coli- <i>stipitatus</i> -A. + <i>M. stipitatus</i>
<i>V 1</i>	1 (2,7)	1 (3,6)	3 (0,2)	
<i>C 1</i>	2—1 (4,2)	2—1 (4,8)	3 (0,1)	3 (0,1)
<i>C 2</i>	2—1 (3,6)	2—1 (4,8)	3 (0,1)	3 (0,1)
<i>C 3</i>	2—1 (4,3)	2—1 (4,0)		3 (0,1)
<i>C 4</i>	2—1 (4,6)	2—1 (4,5)	3 (0,6)	4 (0,0)
<i>C 5</i>	2—1 (4,7)	2—1 (4,5)		3 (0,1)
<i>C 6</i>	2—1 (3,5)	2—1 (3,6)	3 (0,3)	3 (0,1)
<i>C 7</i>	2—1 (3,5)	2—1 (3,5)	3 (0,3)	3 (0,1)
<i>C 8</i>	2—1 (3,2)	2—1 (3,6)	2 (0,3)	4 (0,0)
<i>C 9</i>	2—1 (3,6)	2—1 (4,0)	3 (0,3)	3 (0,1)
<i>U 1</i>	2—1 (3,6)	2—1 (4,0)	3 (0,3)	3 (0,1)
<i>U 2</i>	2—1 (3,0)	2—1 (4,0)	3 (0,3)	3 (0,2)
<i>U 3</i>		2—1 (4,0)		3 (0,2)
<i>U 4</i>	1 (4,1)	2—1 (3,3)	3 (0,1)	3 (0,3)
<i>U 5</i>	2—1 (3,5)	2—1 (4,5)	3 (0,2)	
<i>U 6</i>	2—1 (3,6)	2—1 (3,8)	3 (0,2)	3 (0,1)
<i>Ko</i>	2—1 (4,4)	2—1 (4,2)	3 (0,2)	3 (0,1)

¹ Der Zusatz-Agar wurde durch Zugabe von 22 *stipitatus*-Schalen/100 cm³ Nähragar hergestellt.

6. Zur Untersuchung der Fruchtkörperabhängigkeit von der Temperatur wurden Versuche mit periodisch wechselnder Temperatur angesetzt (Tab. 13). Da das Minimum für die Fruchtkörperbildung zwischen 17° und 20° C liegt, das Maximum zwischen 35° und 40° C und das Optimum bei 25° C, wurde mit den Temperaturen 20° und 25° C gearbeitet, also mit der Minimal- und der Optimaltemperatur. Wenn in einer 24 Std.-Periode die 20° C-Phase zugunsten der 25° C-Phase immer mehr verkürzt wurde, also bei steigender Wärmezufuhr, ergab sich eine aufsteigende Reihe in bezug auf den Fruktifikationsgrad und den Lysiszonendurchmesser. Besonders deutlich trat dieser Befund bei der 1. Revision für den Fruktifikationsgrad und bei der 2. Revision für den

Lysiszonendurchmesser hervor. — Bei einem Vergleich eines 20°:25° C-Verhältnisses von 6:18, 6:42 und 3:21 Std zeigte sich, daß die 42stündige Wärmegabe einen besonders hohen Wert des Lysiszonendurchmessers bewirkte, jedoch nicht einen doppelt so hohen wie beim Versuch mit 3:21 Std. Da das Verhältnis 3:21 Std in bezug auf den Lysiszonendurchmesser in der Größenordnung 6:18 Std und nicht des Verhältnisses 6:42 Std lag, kann geschlossen werden, daß die 25° C-Einwirkung von größerer Bedeutung ist als der 20° C-Einfluß.

Tabelle 13. *Myxococcus fulvus*. Abhängigkeit des Fruktifikationsgrades vom periodischen Wechsel zwischen 20° und 25° C

Verhältnis der Stundenzahlen bei einem Tempe- raturverhältnis von 20°:25° C	Fruktifikationsgrad in Klammern Lysiszonendurchmesser in cm	
	1. Revision	2. Revision
24: 0	3 (1,33)	1 (2,35)
23: 1	3 (1,10)	1 (2,25)
22: 2	3—2 (1,48)	1 (2,40)
21: 3	2 (1,58)	1 (2,52)
20: 4	2 (1,70)	1 (2,52)
18: 6	2 (1,55)	1 (2,57)
12:12	2	1
6:18	1 (2,40)	1 (3,45)
4:20	1 (2,40)	1 (3,45)
3:21	1 (2,22)	1 (3,50)
2:22	1 (2,15)	1 (3,20)
1:23	1 (2,30)	1 (3,50)
0:24	1 (2,38)	1 (3,25)
6:18	1 (2,40)	1 (3,45)
6:42	1 (2,45)	1 (5,30)
3:21	1 (2,22)	1 (3,50)

II. Besprechung

Am übersichtlichsten liegen die Verhältnisse für die von den Fruchtkörpern ausgeschiedene Substanz, die die Fruktifikation beeinflußt, wohl in den Versuchen, bei denen die Organismen auf Agar geimpft wurden, dem Fruchtkörpermasse zugegeben war (Kapitel C. 4). Wenn für die Diffusion der Stoffe, die von diesem Fruchtkörperzusatz in den Agar ausgeschieden wurden, eine bestimmte Zeit bis zur Abtötung und für den Fruchtkörperzusatz selbst eine bestimmte Menge eingehalten wurde, wirkte der so mit einer Myxobakterienart behandelte Agar stets fruktifikationsanregend auf die darauf geimpften Fruchtkörper derselben Art. Aus den Beobachtungen geht weiter hervor, daß fremde Myxobakterienarten, die derselben Gattung angehören, sich nicht gegenseitig stören, wenn bei entsprechenden Versuchen ebenfalls bestimmte Diffusionszeiten und Zusatzmengen berücksichtigt werden. Bei fremden Arten reicht der positive Einfluß jedoch nicht so weit wie bei der eignen Art, so daß von einer relativen Artspezifität des ausgeschiedenen Stoffes gesprochen werden kann.

Im Laufe der Untersuchungen drängte sich ein Vergleich der Myxobakterien mit der Myxomycetenordnung der Acrasieen auf. Bei diesen Organismen fand BONNER (1944; vgl. LANG 1952) einen Induktionsstoff für die Aggregation zum Pseudoplasmodium, den er Acrasin nannte. Bei den Acrasieen liegt der Beweis vor, daß der

Reiz für die Plasmodienbildung in den Myxamöben selbst liegt. Im Gegensatz zu den Myxobakterien (vgl. Teil B, Fütterung mit Myxobakterien) können verschiedene Arten von Acrasieen zu einem gemeinschaftlichen Pseudoplasmodium zusammentreten, trennen sich bei der Fruchtkörperbildung aber wieder oder bilden höchstens physikalische Gemische, aber keine Bastarde (RAPER u. THOM 1941).

Der Vergleich zwischen Myxobakterien und Acrasieen zeigt weiter, daß nicht nur in bezug auf die Fruktifikationsstimulierung, sondern auch im Hinblick auf die Artspezifität und die Diffusionszeit Ähnlichkeiten bestehen, obwohl die Pseudoplasmodien der Acrasieen und Myxobakterien nur homologe Konvergenzerscheinungen darstellen (Acrasieen-Pseudoplasmodium nur fruktifikativ, Myxobakterien-Schwarm fruktifikativ und vegetativ). Nach SHAFFER (1953) werden die Acrasieen-Amöben nicht nur in einer bestimmten Zeitspanne vom Acrasin besonders intensiv angezogen, sondern eine Veränderung der Acrasin-Qualität bewirkt auch, daß *Polysphondylium*-Zentren von einem gewissen Alter an *Dictyostelium*-Amöben anziehen. Die Produktion von *Polysphondylium*-Acrasin scheint gleichzeitig wegzufallen. Umgekehrt zieht *Dictyostelium*-Acrasin immer nur *Dictyostelium*-Amöben an. SHAFFER glaubt, den Grund in geringen Modifikationen des Acrasin-Moleküls erblicken zu dürfen. — Ob die Verhältnisse bei den Myxobakterien ebenso liegen, konnte an Hand der oben beschriebenen Beobachtungen nicht geklärt werden.

Vielleicht liegen der Notwendigkeit einer bestimmten Diffusionszeit bei den Myxobakterien ähnliche Verhältnisse zugrunde wie für die bakteriolytische Substanz der Stäbchen (NORÉN 1953a), die auch erst nach gewisser Zeit wirksam wird. Die Lysis erfolgt in Nährlösung nämlich in 3 Phasen: einer kurzen Periode mit langsamer Lysis, einer mehr oder weniger stockenden Phase und einem Zeitabschnitt mit rascher Lysis.

Da Nähragar ohne jeden Fruchtkörperzusatz nicht die bestmögliche Fruktifikation bewirkt, kann geschlossen werden, daß die Steigerung des Fruktifikationsgrades bzw. die Beschleunigung der Fruktifikation durch die verschiedenen Zugaben von Fruchtkörpersubstanz veranlaßt wird. Das Fruktifikationsstimulans kann aber auch indirekt durch Veränderung des Nährmediums (Eiweißabbau, Aciditätsverschiebung, Feuchtigkeitsänderung u. a.) wirksam sein.

Für die zuletzt erwähnte Annahme spricht eine Beobachtung bei sehr hohen Zusätzen von Kokosmilch, Eipulver und Leberdekokt, die ja auch das Nährsubstrat verändern. Hierbei tritt ein Spiralwachstum der Fruchtkörperringe auf, das nach STANIER (1942c) durch den Aufbau des Substrates aus Riesenmolekülen bestimmt wird. Vermutlich bestehen also Zusammenhänge zwischen Fruchtkörperhemmung und schwer angreifbaren (Eiweiß-)Verbindungen. Es wäre eine interessante Aufgabe, die Konzentrationen mehrerer Nährböden auf diese Grenze hin zu untersuchen, bei der das Spiralwachstum einsetzt.

Nach den letzten Darlegungen ist es verständlich, daß nur wenige Aminosäuren (vgl. Teil B) einen fördernden Einfluß auf die Myxobakterien haben. Um einen besseren Einblick in die Ernährung der noch viel zu wenig untersuchten Myxobakterien zu bekommen, müßte vor allem untersucht werden, ob sie mehr zur Desaminierung oder zur Decarboxylierung der α -Aminosäuren neigen. Da LOEBECK (1954) für *Myxococcus virescens* die Desaminierungsintensitäten angibt (vgl. Teil B, Tab. 4), ist anzunehmen, daß der Abbau der Aminosäuren durch diesen Mikroorganismus in erster Linie an der NH_2 -Gruppe angreift. Dabei ist aber zu bedenken, daß *Myxococcus fulvus* bei derselben Verfasserin bernsteinsaures Natrium nicht verwertete, obwohl Bernsteinsäure als α -Ketosäure ein Desaminierungsprodukt der

α -Aminosäuren bildet. Die Ursache kann daher auch durch das Arbeiten in alkalischem Medium bedingt sein. Die Myxobakterien kommen jedoch in der Natur in alkalischen, neutralen und schwach sauren Böden vor, wie aus der genauen Aufgliederung von H. u. S. KRZMIENIEWSKI (1927 b) hervorgeht. Die wenigsten Formen leben ausschließlich auf sauren Böden.

Man kann also annehmen, daß die Myxobakterien befähigt sind, an 2 verschiedenen Stellen des α -Aminosäuremoleküls anzugreifen, nämlich sowohl an der COOH- wie an der NH₂-Gruppe. An dieser Stelle mag darauf hingewiesen werden, daß die für die CO₂-Abspaltung verantwortliche Decarboxylase als prosthetische Gruppe den Phosphorsäureester des Pyridoxals enthält (BEYER 1955). Das Pyridoxal bildet bekanntlich zusammen mit Pyridoxin und Pyridoxamin das Vitamin B₆. Wenn man mit einer bestimmten günstigen Konstellation von Faktoren arbeitet, wird vielleicht eine Beeinflussung der Myxobakterien auch durch das vollständige Vitamin B₆-Gemisch meßbar werden (vgl. Teil B, Vitamin E und B). Die wirksamen Aminosäure-Decarboxylasen und -Desaminasen und die entstehenden Reaktionsprodukte tragen sicher einen Teil zur Aktivierung weiterer Enzyme bei, die zur Lyse und zur Fruchtkörperbildung benötigt werden.

III. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Fruktifikation und lytisches Verhalten bakterienreiner Stämme von *Myxococcus fulvus*, *M. stipitatus*, *M. virescens* und *Podangium erectum* wurden in ihrer Abhängigkeit von Ernährung und gewissen Fruchtkörpersubstanzen untersucht. Eine fördernde bzw. hemmende Wirkung auf die Schleimbakterien wurde durch Einteilung der Fruktifikation in 7 Stufen und durch Messung des Lysiszonendurchmessers bewertet.

2. Von den zahlreichen, den Kulturen zugesetzten organischen wie zum Teil auch anorganischen Substanzen wirkte Weizenkeimdekot besonders wachstums- und fruktifikationsfördernd gegenüber dem Stammnährboden (Kartoffel-*Escherichia coli*-Agar).

3. Als Futterorganismen wurden den vier Myxobakterienarten 4 Bakterien, 7 Grünalgen, 1 Blaualge, 3 Phycomyceten, 6 höhere Pilze und 1 Acrasiee geboten. Die Ergebnisse sind aus Tab. 1 zu entnehmen.

4. In Flüssigkeitskulturen bildeten die Myxobakterien nur selten Fruchtkörper, z. B. *Myxococcus fulvus* in *Coli*-Suspension und *M. fulvus*, *stipitatus* und *virescens* in 2% igem Kartoffelwasser; mehrere Kulturfolgen ließen sich in keinem der flüssigen Substrate halten.

5. Unter Sauerstoff-Abschluß trat nie Fruktifikation ein.

6. Die Fruchtkörper sondern eine Substanz ab, die auf die Fruktifikation benachbarter vegetativer Stäbchen der eignen Art fördernd wirkt. Auf fremde Arten wirkt sie je nach Diffusionszeit und Menge der Ausgangsfruchtkörper positiv oder negativ. Der Stoff diffundiert durch Agar und gewisse Membranen und ist hitzebeständig.

Literatur

- BAUR, E.: Arch. Protistenkunde **5**, 92—121 (1905). — BEYER, H.: Lehrb. d. org. Chemie, Leipzig (1955). — BONNER, J. T.: Amer. J. Bot. **31**, 175—182 (1944). — FINCK, G.: Arch. Mikrobiol. **15**, 358—388 (1950). — GEITLER, L.: Z. Bot. **17**,

600—603 (1925). — Arch. Protistenkunde **50**, 511—517 (1925). — GERDES, G.: Arch. Mikrobiol. **16**, 53 — 77 (1951). — GERLOFF, G. C., G. P., FITZGERALD, and F.: SKOOG, Amer. J. Bot. **37**, 216—218 (1950). — HESSELTINE, C. W., and J. FENNEL: Nature (Lond.) **175**, 213—214 (1955). — JAHN, E.: Kryptogamenflora der Mark Brandenbg., V. Pilze, Mxyobacteriales, Leipzig, 187—206 (1915). — Beiträge z. botan. Protistologie: Die Polyangiden, Leipzig (1924). — KONONENKO, E. W.: Mikrobiologija **6**, 16—20 (1937 a). — KRZMIENIEZWSKI, H. and S.: Acta Soc. Bot. Polon. **4**, 1—54 (1926); **5**, 102—139 (1927 b). — KÜHLWEIN, H.: Arch. Mikrobiol. **17**, 403—407 (1952 b); **19**, 365—371 (1953). — Zbl. Bakter. I, **162**, 296—301 (1955). — LANG, A.: Fortschr. Bot. **15**, 433—441 (1952). — LEV, M.: Nature (Lond.) **173**, 501 (1954). — LOEBECK, M. E.: Ph. D. Thesis: Univ. Wash., 1—129 (1954). — NORÉN, B.: Sv. bot. Tidskr. **44**, 108—112 (1950 b); **46**, 324—365 (1952 a); **47**, 309—332 (1953 a). — Bot. Not. **81**—134 (1955 a). — OETKER, H.: Arch. Mikrobiol. **19**, 206—246 (1953). — QUEHL, A.: Zbl. Bakter. II, **16**, 9—34 (1906). — RAPER, K. B., and C. THOM. Amer. J. Bot. **28**, 69—78 (1941). — RIPPEL, A., u. B. LEHMANN: Arch. Mikrobiol. **8**, 41—65 (1937). — SHAFFER, B. M.: Nature (Lond.) **171**, 975 (1953). — SINGH, B. N.: J. Gen. Mikrobiol. **1**, 1—9 (1947 a). — STANIER, R. Y.: J. Bacter. **44**, 405—412 (1942 c). — TCHAN, Y.-T., et J. GIUNTINI: Ann. Inst. Pasteur **78**, 415—416 (1950). — VAHLE, K.: Zbl. Bakter. II, **25**, 178—237 (1910). — VOGT, W.: Arch. Entw.mech. **106**, 524—610 (1925); **120**, 384—706 (1929). — YOSHII, Y.: Sci. Rpt. Tohoku Imp. Univ., Sendai **4**, Japan **1**, 277—291 (1926).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

Untersuchungen über den Schwefelumsatz von *Aspergillus niger* *

Von

H. HRUSCHKA

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. April 1957)

Während man sich mit dem Schwefelumsatz der S-autotrophen Bakterien sowie mit der Schwefelwasserstoffbildung bei der Desulfurikation und dem Schicksal der organischen S-haltigen Verbindungen schon vielfach beschäftigt hat, liegen noch recht wenig Mitteilungen über die heterotrophe Verarbeitung von Sulfat-Schwefel zu den organischen Schwefelverbindungen der Mikroorganismensubstanz vor. Sieht man von den ersten Schritten der Sulfatreduktion bei diesem Vorgang ab (einige Literatur bei RIPPPEL-BALDES 1955, S. 100), so ist die Mitteilung von RIPPPEL u. BEHR (1936), wonach sich bei *Aspergillus niger* in der Substratflüssigkeit unter Umständen bis zu 60% des gegebenen Sulfat-Schwefels in unbekannter organischer Form vorfinden kann, bisher völlig vereinzelt geblieben.

Dieser Erscheinung sollte nachgegangen werden, wobei nach Prüfung zahlreicher Stämme von *Aspergillus niger* auf den gleichen Effekt die erwähnte Erscheinung möglichst im Rahmen des Gesamtstoffwechsels verfolgt werden sollte. Ferner wurde eine vorläufige chemische Charakterisierung der fraglichen organischen S-Verbindungen angestrebt. Die Verwendung der ³⁵S-Isotope erwies sich für diese Untersuchungen der verschiedenen S-Fractionen, insbesondere für die Aufstellung einer vollständigen Schwefelbilanz, als unentbehrlich.

Methodik

Kulturmethoden

Die Isolierung der zur Untersuchung verwendeten Stämme aus Bodenproben wurde nach dem Verfahren der Tannin-Elektiv-Kultur von PETERS u. RIPPPEL (1949) vorgenommen. Daraus wurden 36 Einsporkulturen mit Hilfe des Mikromanipulators gewonnen und auf Würze-Agarröhrchen als Impfmateriäl gezogen, in Abständen von 6 Wochen regelmäßig überimpft und nach dem Anwachsen bei Temperaturen unter 20° C aufbewahrt.

* Auszug aus der gleichlautenden Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen 1956.

Das Beimpfen geschah stets mit der gleichen Menge einer Sporensuspension aus 5-tägigen Kulturen. Sie wurde in die sterilen Substrate mit der Rekordspritze (durch Einstechen der Kanüle) durch den Watteverschluß eingetragen.

Nährlösung I		Nährlösung II		Nährlösung III	
Glucose 5%		Glucose 5%		Glucose 20%	
NaNO ₃	1,3%	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,4%	(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,6%
KH ₂ PO ₄	0,05%	K ₂ SO ₄	0,1%	K ₂ SO ₄	0,1%
MgSO ₄	0,006%	MgSO ₄	0,06%	MgSO ₄	0,06%
ZnSO ₄	0,005%	ZnSO ₄	0,005%	ZnSO ₄	0,005%

Citronensäure zum Ansäuern auf pH 6,8

Die Kulturen wurden auf den von RIPPEL u. BEHR (1936) verwendeten Nährlösungen bei einer Temperatur von 27–28° C gezogen. Bevorzugt wurde Nährlösung III angewendet, da alle Stämme auf diesem Nährsubstrat die höchste SO₄'-Verarbeitung aufwiesen und das Wachstum etwa doppelt so schnell und kräftig war, wie z. B. auf Nährlösung I. Es wurde sowohl in Stand- als auch in Schüttelkultur gearbeitet.

Sterilisation stets durch 20 min Erhitzen im Dampftopf bei 100° C bei dreimaliger Wiederholung innerhalb 24 Std. Die fraktionierte Sterilisation mußte bei den vorliegenden hohen Zuckergehalten wegen der starken Karamelisierungsgefahr angewendet werden.

Alle pH-Messungen wurden mit einem Metrohm pH-Meter durchgeführt.

Analysemethoden

Bestimmung der SO₄'. Sie wurde stets durch Fällung mit BaCl₂ als BaSO₄ gravimetrisch bestimmt. In jedem Falle wurden 3 Parallelbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte errechnet. Zur Abtrennung größerer SO₄'-Mengen aus dem Nährsubstrat erwies sich die Schnellfällungsmethode nach FISCHER (1935) als besonders gut geeignet. Die erhaltenen BaSO₄-Niederschläge waren grobkörnig und gut filterbar.

Bestimmung des organisch gebundenen Schwefels: Der Mycel-, Eiweiß- und Hydrazonschwefelgehalt wurde nach dem Halbmikroverfahren von WURZSCHMITT (1950) ermittelt. Der Aufschluß erfolgte mittels einer Nickelbombe. Die Einwaagen des aufzuschließenden Materials unterschritten in den seltensten Fällen die Menge von 100 mg. Jeder Aufschluß wurde, soweit dies die Gesamtmenge der zur Verfügung stehenden Analysensubstanz zuließ, 2–3mal vorgenommen. Die anschließende SO₄'-Bestimmung wurde in der herkömmlichen Weise durchgeführt.

Trockenmycelgewichtsbestimmung: Das Mycel wurde nach dem Absaugen an der Wasserstrahlpumpe mit 0,5 l warmem Wassers (70° C) gründlich gewaschen, erneut scharf abgesaugt und dann auf Petri-Schalen im Trockenschrank bei 70–80° C getrocknet, darauf in der Reibschale grob zermahlen und vollständig in Glaswägeschälchen überführt. Die Wägeschälchen wurden über Nacht im Vacuumexsiccator über P₂O₅ aufbewahrt und nach Aufsetzen des Schliffdeckels gewogen. Bei der Aufstellung der Wachstumskurven wurden bis zu 8 Parallelkurven zur Mycelgewichtsbestimmung herangezogen und die Mittelwerte errechnet (s. MEYER 1928, 1930).

Atmungsmessung: In der Warburg-Apparatur mit KOH als CO₂-Absorber. In die Kulturkölbchen wurden je 2,5 cm³ Nährlösung III, die allerdings nur 10% Glucose enthielt, eingefüllt und jeweils mit der gleichen Menge Sporensuspension beimpft. Wachstum bei konstanter Temperatur von 27° C. Die Messungen wurden

an 3 Parallelen bei 1stündiger Ablesung über einen Zeitraum von 45 Std durchgeführt.

Alkoholbestimmung: Oxydation mittels Bichromat und anschließende jodometrische Ermittlung des Bichromatverbrauchs nach NEISH (1952), JANKE u. KRIPASZI (1935).

Bestimmung organischer Säuren: Die Untersuchungen erstreckten sich auf den qualitativen Nachweis niederer Fettsäuren im Substrat. Die schwefelsauren Substrate (je 100 cm³) wurden mit Äther nach KUTSCHER-STEUDLE extrahiert (Extraktionsdauer 10—12 Std) und die Extrakte papierchromatographisch auf ihren Gehalt an verschiedenen Fettsäuren nach der Methode von REID (1951) und der von PAECH u. TRACEY (1955) untersucht. Die Brenztraubensäurebestimmung konnte im Destillat der Wasserdampf- und fraktionierten Destillation auch nach BAUER (1950) mit α - und β -Naphthol als Nachweisreagens vorgenommen werden.

Vitamin B₂-Nachweis: Die schon im Tageslicht stark gelbgrün fluorescierenden Substrate der Riboflavinbildner wurden ohne weitere Aufarbeitung untersucht. Der qualitative Nachweis erfolgte auf chemischem und mikrobiologischem Wege mit *Lactobacillus casei* als Testorganismus (VOGEL u. KNOBLOCH 1955).

Substrat-Eiweißaufarbeitung: Nach eingehenden Vorversuchen wurde die Ausfällung des Gesamteiweißes der Nährlösung, wie es der Substrataufarbeitungsgang verlangte, in der Regel durch Ausfällen mit Phosphorwolframsäure vorgenommen und in besonderen Fällen durch diese Fällung noch nicht vollständig erfaßtes Substrateiweiß mittels Cl₃C · COOH abgetrennt.

Bei der Untersuchung der Substrat-Eiweißbildung in verschiedenen Wachstumsstadien wurde in Schüttelkultur gearbeitet. Als Kulturgefäße dienten 1 l-Enghalskolben, die jeweils 200 cm³ Nährlösung III enthielten. Die Eiweißfällung wurde vor dem Wiegen genau so getrocknet und aufbereitet wie das Mycel, nur wurden die Niederschläge durch Aceton-Behandlung vorgetrocknet (s. BELOSERSKI u. PROSKURJAKOW 1956). Diesen Untersuchungen dienten die Arbeiten von OLKOTT (1947), ASTRUP (1947), sowie HILLER (1922) als Experimentiergrundlage.

Papierelektrophoretische Untersuchung: Auf übliche Weise durch Fällung mit Phosphorwolframsäure und Trichloressigsäure gewonnenes Eiweiß konnte zu diesen Untersuchungen nicht herangezogen werden, da es nicht wanderte. Daher wurde das Eiweiß in einem von SO₄ befreiten und im Vacuum eingeeengten Substrat in Kollodium-Dialysierhülsen (Membranfilterges. Göttingen) angereichert. Diese Eiweißanreicherung aus jeweils 0,5 l Substrat lieferte gute Ergebnisse. — Im einzelnen wurde mit Glykokoll-Puffer, pH 9,6, einer Stromstärke von 7 Milliamp. und einer Laufzeit von 10 Std gearbeitet. Die Angaben von WUNDERLY (1954) dienten als Richtlinien. Die Streifen wurden mit Azocarmin B gefärbt.

Papierchromatographie: Auch hierbei lieferte durch Dialyse gewonnenes Eiweiß bessere Ergebnisse; vor allem konnte die Hydrolysendauer verringert werden. Die Untersuchungen trugen rein qualitativen Charakter, da es ja auch in erster Linie auf die Erfassung der S-haltigen Aminosäuren ankam. Es wurde im eindimensionalen, aufsteigenden Verfahren mit Butanol-Eisessig als Lösungsmittel nach CRAMER (1955) gearbeitet.

Zur Kontrolle wurden die Versuche auch mit anderen Lösungsmittelgemischen, z. B. Picolin-Eisessig, durchgeführt. Ebenso wurden die einzelnen Aminosäuren nach ihrer Identifizierung in reiner Form einem Teil des Hydrolysates zugefügt und dieses dann erneut einer papierchromatographischen Untersuchung unterworfen. Erst nach Übereinstimmung dieser Chromatogramme mit den reinen Hydrolysat-Chromatogrammen wurden die Ergebnisse als ausreichend gesichert betrachtet.

Hydrolyse: Da bei der Hydrolyse nach CRAMER (24stündiges Kochen mit 2 n HCl im zugeschmolzenen Glasrohr) besonders die S-haltigen Aminosäuren ganz oder teilweise zerstört werden, mußte im vorliegenden Fall anders verfahren werden. Die Hydrolyse wurde mit 30 cm³ 2 n HCl und einer Spur SnCl₂ als Katalysator durch 4stündiges Kochen unter Rückfluß vorgenommen. Diese Zeit reichte aus, um eine vollständige Hydrolyse zu gewährleisten. Das Hydrolysat wurde im Vacuum von der HCl befreit und der Rückstand in dest. Wasser und einigen Tropfen Amylalkohol aufgenommen. Die Chromatogramme wurden mit Ninhydrin und parallel dazu nach einem besonderen Verfahren von GRÜNE (1953) zur Sichtbarmachung der S-haltigen Aminosäuren entwickelt (vgl. auch CHARGAFF u. Mitarb. 1948, Na-azid-Jod-Reagens).

Glutathion-Bestimmung: Sie wurde nach der Methode von KÜHNAU (1931) jodometrisch vorgenommen.

Abtrennung der Restglucose und anderer Aldehyd- und Ketogruppen enthaltender Verbindungen: Die Substrate mußten im Verlaufe ihrer Aufarbeitung von dem zum Teil noch recht großen Restglucosegehalt befreit werden. Dieser störte viele Nachweisreaktionen und bildete beim starken Einengen zähe, dunkelbraune Schmierer, Caramelsubstanzen, die auf mechanischem Wege aus den Glasgefäßen nicht entfernbar waren und so einer genauen S-Bestimmung nicht zugänglich gemacht werden konnten.

Die Abtrennung der Zucker und sämtlicher im Substrat noch vorhandener Keto- und Aldehydgruppen enthaltender Verbindungen geschah durch Fällung mit dem gebräuchlichen 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens nach BAUER (1950). Das Reagens wurde in 2 n HCl gelöst und gebrauchsfertig gemacht. Die Fällung wurde in stark eingeeengten Substraten direkt im Rundkolben bei 60° C unter längerem Rühren vorgenommen. Nach Abfiltrieren des kristallinen Niederschlags wurde das Filtrat erneut stark im Vacuum eingeeengt und die ausfallenden Hydrazone wieder abfiltriert.

Die S-Gehaltsbestimmung dieser Niederschläge wurde nach dem Umkristallisieren aus Äthanol (96% ig) wie bei der Bestimmung des Mycel- und Eiweißschwefels vorgenommen.

Aufarbeitung und Trennung der Hydrazone: Die erhaltenen Rohhydrazone wurden aus Äthanol umkristallisiert, über Silicagel im Vacuumexsiccator getrocknet und dann in der Soxhletapparatur mit Benzol als Lösungsmittel extrahiert, bis das ablaufende, um die Extraktionshülse angesammelte Lösungsmittel farblos war. Der noch verbleibende Hydrazonrückstand wurde dann durch Extrahieren mit Äthanol quantitativ aus der Extraktionshülse herausgelöst.

Benzol- und Äthanolextrakt wurden im Vacuum zur Trockene eingeeengt, beide aus Äthanol umkristallisiert und in hochkonzentrierter äthanolischer Lösung auf die *Adsorbersäule* gebracht. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß saures Al₂O₃ Aktivitätsstufe I der Firma Woelm am besten als Adsorbens geeignet ist. Es wurde nach der verdrängungschromatographischen Methode zunächst mit Benzol und bei Entfernung der letzten Zone mit Aceton als Lösungsmittel gearbeitet. Die einzelnen durchlaufenden Zonen wurden jede für sich nach gründlichem Einengen nochmals auf saurem, neutralem und basischem Al₂O₃ mit der Absicht eventueller weiterer Auftrennung in mehrere Komponenten untersucht. Als Grundlage dieser Untersuchungen diente die Abhandlung von ZECHMEISTER u. CHOLNOKY (1933). Die Methoden von MARKEES (1955) sowie FRIEDEMANN (1943) u. HAUGEN (1943) zur papierchromatographischen Trennung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone erwiesen sich in vorliegendem Falle aus nicht näher bekannten Gründen als unbrauchbar.

Substrataufarbeitungsgang: Nachfolgend beschriebener Aufarbeitungsgang wurde in jedem Falle und bei allen Entnahmen, gleich welchen Wachstums-

stadiums, eingehalten: 1. Abfiltrieren des Mycels, Myceltrocknung und Schwefelgehaltsbestimmung. — 2. pH-Messung. — 3. Auffüllen des Substrats mit dest. Wasser auf sein ursprüngliches Volumen. Bestimmung des SO_4^{2-} -Gehaltes. — 4. Ausfällen und Abtrennen der SO_4^{2-} aus dem Gesamtsubstrat in salzsaurer Lösung nach der Schnellfällungsmethode. — 5. Fällung der Eiweißverbindungen im Substrat mit Phosphorwolframsäure und Trichloressigsäure im schwach sauren bis neutralen pH-Bereich. Abtrennung der Fällung nach starkem Einengen im Vacuum durch Filtration. S-Gehaltsbestimmung der Eiweißfraktion. — 6. Fällung der Aldehyd- und Ketogruppen-enhaltenden Verbindungen im stark eingengten Filtrat der Eiweißfällung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin, gelöst in 2 n HCl. Abfiltrieren der kristallinen Niederschläge nach erneutem starkem Einengen unter vermindertem Druck. Umkristallisieren der Niederschläge aus 96% igem Äthanol, Trocknung und S-Gehaltsbestimmung.

Laufende Glutathionbestimmungen im Substrat wurden nicht durchgeführt. Sie wurden in Parallel-Kulturen, die eigens zu diesem Zweck angesetzt wurden, unabhängig vom üblichen Trennungsgang durchgeführt.

Bestimmung der freien SH-Gruppen im Substrat: Sie erfolgte spektral-photometrisch nach BOYER (1954).

Fraktionierte Destillation: Es wurde jeweils 1 l Nährsubstrat gleich nach Abtrennung des Mycels destilliert. Dieser enthielt demzufolge noch Rest- SO_4^{2-} -S, Eiweiß, als Hydrazone fällbare Verbindungen usw. Es wurde über eine 1,2 m lange, einfache Glaskolonne, gefüllt mit Raschig-Ringen, am Luftbad fraktioniert.

Wasserdampfdestillation: Sie wurde in der üblichen Glasapparatur an ebenfalls je 1 l, lediglich vom Mycel befreitem Rohsubstrat vorgenommen.

Nachweis von Mercaptanen: Er erfolgte in den verschiedenen Fraktionen der fraktionierten Destillation nach GROTE (1931) mit dem Na-Aquoferriicyanidreagens. Auch Versuche zur Ausfällung der Mercaptane mit 2,4-Dinitrochlorbenzol in alkoholischer Lösung nach BOST (1935) wurden durchgeführt. Hierbei wurden die Destillate in Vorlagen, die Alkohol und Reagens enthielten, unter schwachem Rühren (Magnetrührer) aufgefangen.

Ätherschwefelsäuren: Die Abwesenheit dieser Verbindungen konnte in gleicher Weise wie durch RIPPEL u. BEHR (1936) über saure Verseifung nachgewiesen werden (2stündiges Kochen von je 100 cm³ Substrat mit 2 n HCl unter Rückfluß). Zur Unterscheidung der verschiedenen, SH-, -S-S- und S-Gruppen enthaltenden, möglicherweise vorliegenden Verbindungen mußten noch die Nachweisreaktionen nach KASSELL u. BRAND (1938) (mit Phosphorwolframsäure Blaufärbung bei Gegenwart freier SH-Gruppen) und nach ARNOLD (1910) mit Nitroprussidnatrium angewendet werden.

Anwendung von ³⁵S-markierter H_2SO_4 : Es wurden die bei biologischen und medizinischen Untersuchungen allgemein üblichen Relativmessungen vorgenommen. Zu 800 cm³ Nährlösung III wurden 1,5 mC trägerfreier $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ zugesetzt und 3 Stämme (I, 2 und 4285) in 300 ml Enghals-Kolben zu je 70 cm³ Nährlösung bei 27° C in Standkultur gezüchtet. Die Untersuchung nach dem üblichen Substrat-aufarbeitungsgang erstreckte sich bei jedem Stamm auf 3 verschiedene Wachstumsstadien.

Die Messung der ³⁵S-Aktivität wurde stets an BaSO_4 -Niederschlägen unendlicher Schichtdicke unter dem Glockenzählrohr vorgenommen. Die geometrische Anordnung der Meßvorrichtung blieb im Verlaufe der 18tägigen Untersuchung gleich. Alle Messungen wurden am gleichen Gerät mit demselben Zählrohr durchgeführt. Die $\text{Ba}^{35}\text{SO}_4$ -Niederschläge wurden nach gründlichem Trocknen zum Zwecke der Berechnung der Schichtdicke der Präparate gewogen, was zur Ermittlung der

Selbstabsorption erforderlich war. Die Umrechnung des Gewichtes der Niederschläge auf die Fläche des zur Messung gelangenden Präparates in mg/cm^2 wurde dadurch erleichtert, daß die Niederschläge stets auf den gleichen kleinen, runden Membranfiltern (bekannten Gewichts und bekannter Flächen) abgesaugt, getrocknet, gewogen und gemessen wurden. Diese Anordnung gewährleistete die ausreichende Genauigkeit zur Erlangung vergleichbarer Meßwerte.

Standard-Bereitung: Die Halbwertszeit des ^{35}S -Isotops von 87,5 Tagen erforderte eine Berücksichtigung der Zerfallsrate bei der Errechnung der Endwerte. Auch mußten die hohen Schwankungen der täglich gemessenen Nullraten in Betracht gezogen werden. Um diese zu erfassen, wurde ein Teil der unbeimpften Nährlösung III unter Toluol aufbewahrt und aus je 2 cm^3 derselben täglich die SO_4^{2-} als BaSO_4 ausgefällt und die Aktivität dieses Präparates umgerechnet auf das Gesamtvolumen der einzelnen Nährsubstrate (70 cm^3) gleich 100% gesetzt.

Untersuchung der SO_4^{2-} -Bindung an das Substrateiweiß mittels ^{35}S -markierter H_2SO_4 : Die Untersuchung wurde an den Stämmen 1, 2 und 4285 in je 3 verschiedenen Wachstumsstadien vorgenommen. Kultiviert wurde auf je 50 cm^3 inaktiver Nährlösung III in Standkultur bei $27\text{--}28^\circ\text{C}$.

Bei jeder Entnahme wurde folgendermaßen verfahren: Nach dem Absaugen des Mycels wurde das Substrat im 50 cm^3 -Meßkolben mit dest. Wasser auf sein ursprüngliches Volumen aufgefüllt. Dann wurden jedem Substrat $50\text{ }\mu\text{C}$ trägerfreier, ^{35}S -markierter H_2SO_4 zugefügt und nach Durchmischung jeweils geteilt, also Mengen von je 25 cm^3 der gleichen Probe quantitativ in Bechergläser überführt. Diese Proben blieben über Nacht bei Zimmertemperatur stehen, um einen vollständigen Austausch der gebundenen SO_4 -Ionen gegen die zugesetzten ^{35}S -aktiven SO_4^{2-} am Substrateiweiß zu gewährleisten.

Während nun in der einen Hälfte der aktiven Substrate (Reihe A) zuerst SO_4^{2-} gefällt und die Aktivität der BaSO_4 -Niederschläge wie beschrieben gemessen wurde, und erst im Filtrat der BaSO_4 -Fällung das Substrateiweiß wie üblich gefällt, getrocknet, eingewogen, in der WURZSCHMITT-Bombe aufgeschlossen, die SO_4^{2-} -Aktivität des ausgefallenen BaSO_4 -Niederschlags gemessen wurde, konnte bei der Aufarbeitung der anderen Hälfte der Substrate (Reihe B) genau in umgekehrter Weise verfahren werden. Hier erfolgte zuerst die Eiweißfällung und dann die SO_4^{2-} -Fällung.

Alle erhaltenen Meßwerte wurden an einem Standard, der aus unbeimpfter Nährlösung III, welcher ebenfalls $50\text{ }\mu\text{C}/50\text{ cm}^3$ ^{35}S -markierte, trägerfreie H_2SO_4 zugefügt worden war, verglichen.

Anfertigung von Autoradiogrammen: Von den Papierchromatogrammen und Elektropherogrammen, welche aus aktivem Eiweiß angefertigt wurden, konnten Autoradiogramme hergestellt werden. Dies geschah durch direktes Auflegen von Röntgenfilm und mehrtägigem Exponieren unter völligem Lichtabschluß. Im wesentlichen wurde bei den Untersuchungen unter Verwendung von ^{35}S -markierter H_2SO_4 nach den Angaben von SCHWIEGK (1953), WINTERINGHAM (1952) sowie SOLOWAY (1952) gearbeitet.

Experimenteller Teil

Wachstumskurven

Die starke SO_4^{2-} -Verarbeitung dürfte bei *Aspergillus niger*-Stämmen als weit verbreitete Allgemeinerscheinung anzusehen sein. Sie erreicht ihre Höchstwerte bei einer Kultivierung der Stämme auf Nährlösung III (20%ige Glucoselösung). Tab. 1 gibt eine Übersicht über die maximale

SO₄'-Verarbeitung im Substrat von 40 verschiedenen *Aspergillus niger*-Stämmen mit gleichzeitiger Angabe des p_H-Wertes im Zeitpunkt des Maximums der SO₄'-Abnahme.

Die Untersuchungen wurden an je 100 cm³ Substrat in 300 ml Enghalskolben vorgenommen. Der p_H-Wert der Substrate wurde vor dem Beimpfen auf 6,8 eingestellt. Ihr S-Gehalt betrug 21,9 mg SO₄'-S/100 cm³. (Dieser Betrag wurde bei der Errechnung der SO₄'-Abnahme gleich 100 gesetzt.)

Tabelle 1. SO₄'-Verarbeitung durch *Aspergillus niger*-Stämme
Nährlösung III

Stamm Nr.	Maximum der SO ₄ '-Abnahme	p _H
32; 4216;	10—20	4,2; 3,9;
24; 26 ¹ ; 27; 28; 31; 4215; 4217;	20—30	3,1; 3,4; 3,4; 3,1; 4,2; 4,1; 3,1;
12; 13; 14; 15; 18; 21; 25; 34; 35 ¹ ; 36 ¹ ;	30—40	3,1; 3,4; 3,2; 3,2; 4,1; 3,4; 2,8; 2,7; 2,8; 2,8;
7 ¹ ; 8; 9; 11 ¹ ; 16 ¹ ; 17; 19; 22 ² ; 23; 33 ² ;	40—50	2,4; 2,7; 2,9; 2,9; 3,1; 3,8; 2,9; 2,7; 2,4; 1,2;
5 ¹ ; 6 ² ; 20 ¹ ; 30 ¹ ;	50—60	2,3; 2,1; 1,9; 2,0;
10 ² ; 29 ² ; 4285 ² ;	60—70	2,8; 1,9; 1,6;

Maximum der SO ₄ '-Abnahme in %	Nährlösung III		Nährlösung II	
	Stamm Nr.	p _H	Stamm Nr.	p _H
40—50	4 ² ;	2,1;	2 ¹ ; 3 ¹ ; 4 ² ; 5 ¹ ;	2,2; 2,6; 2,5; 2,3;
50—60	2 ¹ ; 3 ¹ ; 5 ¹ ;	1,8; 1,9; 2,3;	1 ¹ ; 4285 ² ;	2,1; 1,9;
60—70	1 ¹ ; 4285 ² ;	1,8; 1,6;	—	—

¹ Stamm bildete nach seiner Isolierung aus dem Erdboden sofort Riboflavin.

² Bedeutet, daß Riboflavinbildung erst nach einigen Passagen des Impfmateri- als auf Würze-Agar eintrat.

Den Verlauf der SO₄'-Verarbeitung und die gleichlaufende p_H-Wert-Änderung im Substrat der *Aspergillus niger*-Kulturen zeigt Abb. 1 an 2 Stämmen. Es wurde in Standkultur in 300 ml Enghalskolben auf jeweils 100 cm³ Nährlösung III mit einer Anfangs-SO₄'-Konzentration von 28 mg/100 cm³ und p_H 6,8 kultiviert. Bei allen untersuchten Stämmen wurde beobachtet, daß die stärkste Substratsäuerung stets im Verlaufe des Stoffwechselgeschehens zeitlich mit dem Stadium der höchsten SO₄'-Verarbeitung (SO₄'-Verlustmaximum) zusammenfällt. Nimmt die H⁺-Konzentration ab, was beim Autolysieren der Kulturen der Fall ist, so nimmt gleichzeitig die Menge des durch BaCl₂ fällbaren S zu.

Zur genaueren Fixierung der Lage des Maximums der SO₄'-Abnahme im Gesamtstoffwechselgeschehen und im Wachstumsverlauf wurden nun

Atmungsmessungen und Trockenmycelgewichtsbestimmungen vorgenommen. Bei allen Atmungsmessungen wurden Parallelbestimmungen der SO_4'' -Verarbeitung, des Trockenmycelgewichtes und pH -Messungen im Substrat gleichzeitig mit durchgeführt. Zur einwandfreien Ausführung dieser Parallelbestimmungen wurden gleichzeitig mit den Warburg-

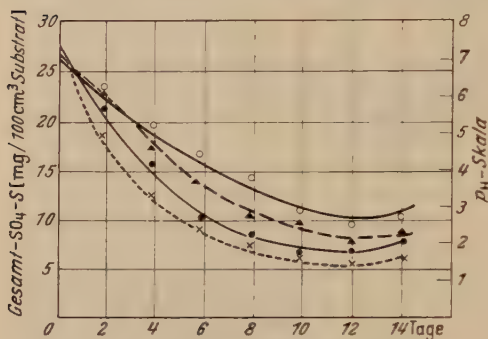


Abb. 1. SO_4'' -Verarbeitung und pH -Kurven zweier *Asp. niger*-Stämme. Stamm 2 • pH -Kurve, ○ SO_4 -S; Stamm 3 × pH -Kurve, △ SO_4 -S

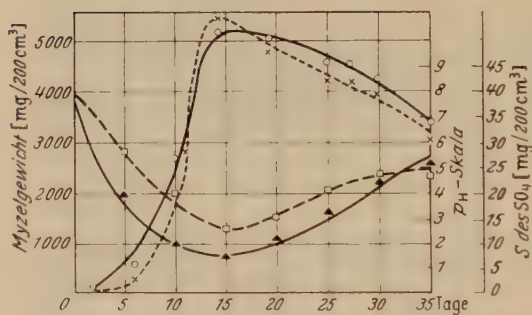


Abb. 2. Wachstumskurven (Mycelrockengewicht) der Stämme 1 und 2 sowie SO_4'' -Verarbeitungs- und pH -Kurve von Stamm 1. Wachstumskurven: ○ Stamm 1, × Stamm 2, □ SO_4 -S, △ pH -Kurve

neben einer sehr hohen SO_4'' -Verarbeitung ein besonders rasches Wachstum aufwiesen. Abb. 2 zeigt die Wachstumskurven der Stämme 1 und 2, sowie die zugehörige pH - und SO_4'' -Verarbeitungskurve von Stamm 1.

Bei fast allen untersuchten Stämmen fielen die Maxima der SO_4'' -Verarbeitung und die Mycelhöchstgewichte im Entwicklungsablauf der Pilze zeitlich zusammen. Auch die stärkste Substratsäuerung wurde in diesem Wachstumsabschnitt beobachtet. Relativ starke Abweichungen hiervon zeigte, wie aus Abb. 3 hervorgeht, nur Stamm 4.

Messungen Schüttelkulturen in 100 ml-Enghalskolben auf jeweils der 10-fachen Menge der in den Kulturgefäßen der Warburg-Apparatur verwendeten Nährlösung bei annähernd gleicher Schüttelfrequenz gezogen. Die erhaltenen Werte wurden rechnerisch auf die in den Warburg-Kölbchen vorliegende Substratmenge bezogen.

Bei allen untersuchten Stämmen war die zeitliche Reihenfolge: Atmungs-Mycelgewichts-Maximum der SO_4'' -Verarbeitung im Gesamtstoffwechselgeschehen deutlich erkennbar.

Die Wachstumsmessungen unter Zugrundelegung des Myceltrockengewichts wurden nun wie alle folgenden Untersuchungen an 6 *Asp.*-Stämmen vorgenommen, wobei die Stämme ausgewählt wurden, welche

Gesamt-S-Gehalt im Mycel

In Verbindung mit den Trockenmycelgewichtsbestimmungen wurde laufend auch der S-Gehalt des Mycels ermittelt. Abb. 4 läßt ein außerordentlich starkes Absinken des Mycel-S-Gehalts mit dem Einsetzen der

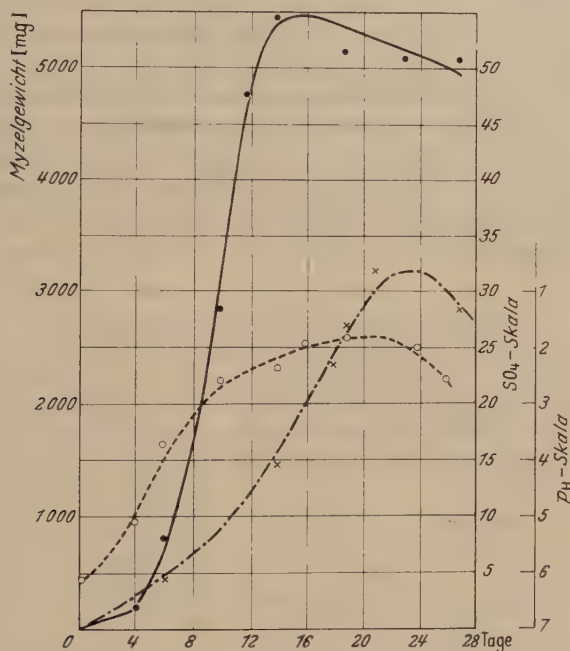


Abb. 3. Wachstums- SO_4 -Verarbeitungs- und pH -Kurve von Stamm 4. \circ pH -Werte, \times SO_4 -Verarbeitung bezogen auf 200 cm^3 Nährlösung III, Abnahme in mg, \bullet Wachstum

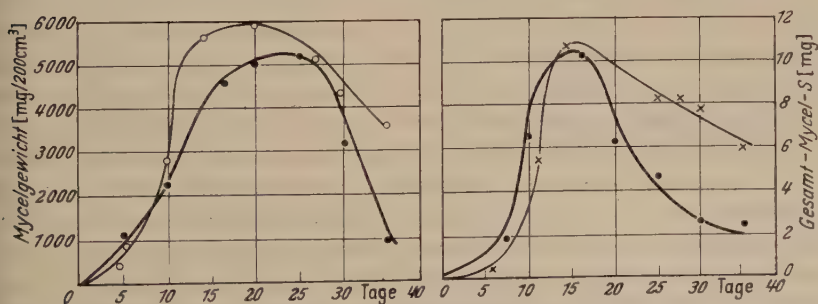


Abb. 4. Mycel-S-Gehalt der Stämme 1 und 2 (die nicht gezeichneten Kurven der Stämme 4285 und 3 entsprachen 2 bzw. 1). — Mycel-S, — Mycel-Gewicht

Autolyse erkennen (Stamm 4285 und 2). Bei einzelnen Stämmen stieg dieser jedoch noch kurze Zeit nach Beginn der Autolyse leicht an, um dann erst sehr steil abzusinken (Stamm 1 und 3).

Alkohol- und Säurebildung

Um weitere Stoffwechselvorgänge zu erfassen, wurde bei den 6 Untersuchungsstämmen die Alkoholbildung und die Bildung organischer Säuren in den Substraten untersucht. Die bei allen Untersuchungsstämmen im Substrat enthaltenen Eiweißkörper mußten genau untersucht werden ebenso wie das schon von RIPPEN u. BEHR (1936) im Substrat von *Asp. niger* nachgewiesene Glutathion. Parallel zu allen diesen Bestimmungen wurden jeweils die SO_4'' -Verarbeitung und die p_H -Werte in den Substraten bestimmt. Erst unter voller Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Untersuchungen war die Auswahl geeigneter Abtrennungs- und Bestimmungsmethoden zur Aufstellung der S-Bilanzen und die Charakterisierung bisher unbekannter S-organischer Verbindungen aus den Kultursubstraten möglich.

Tabelle 2. *Alkoholbildung der Asp. niger-Stämme*

Maxima der SO_4'' -Verarbeitung in %	Standkulturen		Schüttelkulturen	
	Alkohol in mg/200 cm ³	Stamm Nr.	Alkohol in mg/200 cm ³	Stamm Nr.
30—50	189;	5;	84;	5;
50—60	215; 238;	6; 4;	186;	1;
60—70	324; 280; 353;	29; 1; 3;	260; 294; 162; 174;	29; 3; 4; 6;
70—80	368;	4285;	207;	4285;

Alle 6 untersuchten Stämme bildeten in Standkultur aerob zum Teil recht beträchtliche Mengen Alkohol, wie Tab. 2 für Stand- und Schüttelkultur zeigt. Die gleichfalls aufgezeichneten Maxima der SO_4'' -Abnahme sollen lediglich die Fähigkeit der einzelnen Stämme zur SO_4'' -Verarbeitung aufzeigen. Auch die Belüftungskulturen wiesen eine Alkoholbildung von 4—42 mg je Kultur und eine 12—56%ige SO_4'' -Verarbeitung auf.

Allgemein bildeten alle Untersuchungsstämmen auf Nährlösung III erhebliche Mengen Alkohol, besonders in aerober Standkultur. Bei den Stämmen mit der höchsten SO_4'' -Verarbeitung konnten die größten Alkoholmengen nachgewiesen werden. Zeitlich liegt die maximale Alkoholbildung im Stoffwechselgeschehen vor dem Maximum der SO_4'' -Abnahme, während die stärkste Bildung organischer Säuren zeitlich mit der maximalen SO_4'' -Verarbeitung zusammenfällt. Überhaupt konnten die in jedem Entwicklungsstadium gebildeten organischen Säuren mit Hilfe der nur qualitativ-orientierend vorgenommenen papierchromatographischen Untersuchung nur in kleinen Mengen nachgewiesen werden. Da es sich um sehr kleine Mengen handelt, wurde auf eine quantitative Be-

stimmung verzichtet. Stamm 1 erwies sich als Citronensäure-¹, Stamm 4285 als Oxalsäurebildner. Brenztraubensäure konnte fast bei allen Stämmen und in den meisten Wachstumsstadien nachgewiesen werden, während Propionsäure und Bernsteinsäure weniger oft und nur in kleinsten Mengen nachgewiesen werden konnten.

Zusammenhang und Verlauf der beiden konkurrierenden Stoffwechseltypen, die in der Alkoholbildung einerseits und in der Fettsäurebildung andererseits ihren Ausdruck finden, ergaben das gleiche Bild, wie es im wesentlichen von RAVEUX (1950, 1954) und SCHMIDT-LORENZ (1955) ausführlich erörtert und beschrieben wurde. Eigenartig und unerklärlich blieb allerdings die Feststellung, daß die Bildung von Citronensäure, die ja im stark sauren pH-Bereich der Substrate hätte begünstigt sein müssen (vgl. RIPPEL-BALDES 1955, S. 184), nur bei einem einzigen Stamme nachgewiesen werden konnte.

Substrat-Eiweiß und Glutathion

Durch Ausfällung mittels Phosphorwolframsäure und Trichloressigsäure konnte in den meisten Fällen eine quantitative Ausfällung des Substrat-Eiweißes erreicht werden. Lediglich bei den Stämmen 29, 4 und 5 verblieb eine schwer abtrennbare Eiweiß-Restfraktion². Abb. 5 zeigt die Substrat-Eiweißbildung im Verlaufe des Wachstums bei 3 Stämmen, die nach HILLER (1922) gravimetrisch über die sorgfältig getrockneten Fällungen verfolgt werden konnte. Das hohe Gewicht der Eiweißfällungen erklärt sich aus dem sehr großen spezifischen Gewicht der Phosphorwolframsäure, die zur Fällung in beträchtlicher Menge angewandt werden mußte. (Der Eiweißanteil der Phosphorwolframsäure-Fällungsniederschläge beträgt etwa 1,8—2% reines Eiweiß bezogen auf den Trockenniederschlag.)

Der Verlauf der Substrat-Eiweißbildung zeigte bei allen Untersuchungsstämmen im frühen Stadium des aktiven Wachstums einen steilen Anstieg. Lange vor dem Erreichen der Mycelhöchstgewichte sinkt der Eiweißgehalt stark ab, um dann erst wieder im Zeitpunkt der Autolyse

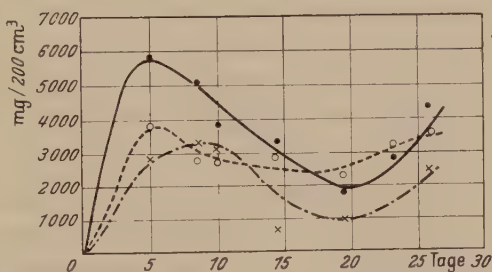


Abb. 5. Substrat-Eiweißbildung (Phosphorwolframsäureniederschläge; gravimetrische Auswertung). Substrat-Eiweiß in 200 cm³ Nährlösung III.

• Stamm 1, ○ Stamm 2, × Stamm 3

¹ Wurde gesondert gravimetrisch als Ca-Salz bestimmt (vgl. SCHMIDT-LORENZ 1956).

² Fällbar nur mit Sulfosalicylsäure, jedoch nur sehr kleine Mengen.

anzusteigen. Gleichzeitig vorgenommene pH -Messungen und SO_4^{--} -Bestimmungen im Substrat ergaben einen normalen Verlauf wie in Abb. 2. Lediglich bei Stamm 4 (Abb. 6) konnte ein ausgesprochen abnormer Verlauf der pH -Kurve festgestellt werden (vgl. auch Abb. 3). Die höchste H^+ -Konzentration im Substrat trat hier lange vor Erreichen des Maximums der SO_4^{--} -Verarbeitung auf.

Die papierelektrophoretische Untersuchung von dialysiertem Substrat-Eiweiß ergab bei allen Untersuchungsstämmen zwei hinsichtlich ihrer

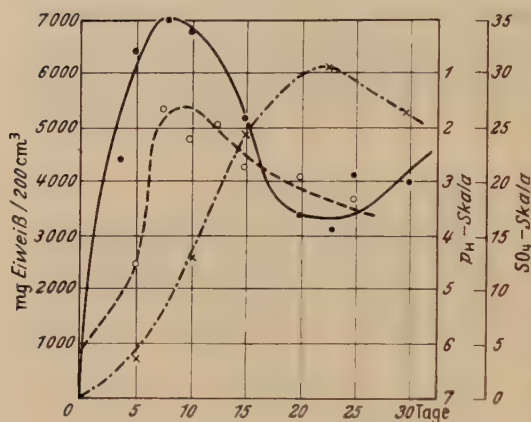


Abb. 6. Substrat-Eiweiß-, SO_4^{--} -Verarbeitungs- und pH -Kurve von Stamm 4. \circ pH -Kurve, \times SO_4^{--} -Abnahme in mg/200 cm³

Ladung und Wanderungsgeschwindigkeit verschiedene Substrat-Eiweißfraktionen, wodurch auch die Abtrennung der Gesamtsubstrat-Eiweißfraktion mittels Fällung durch zwei verschiedene Fällungsmittel (nacheinander im gleichen Substrat) erklärlich wird.

Die qualitative und halbquantitative papierchromatographische Untersuchung der Substrat-Eiweiß-Hydrolysate der Untersuchungsstämmen, besonders im Hinblick auf deren Gehalt an S-Aminosäuren,

zeigte, daß Methionin in allen Wachstumsstadien ebenso wie Cystin-Cystein, jedoch in größerer Menge als letztere, vorhanden war. Cyclische Aminosäuren konnten nicht nachgewiesen werden. Im übrigen ergaben sich hinsichtlich des Vorkommens an Protein-Aminosäuren und deren mengenmäßigen Vorliegen ähnliche Verhältnisse, wie sie zum Teil bei anderen Mikroorganismen schon gefunden wurden (vgl. PFENNIG 1956, RIPPEL-BALDES u. Mitarb. 1956, RITTER 1954). Außer den genannten konnten keine weiteren S-haltigen Aminosäuren nachgewiesen werden (vgl. S. 238 Radiogramm).

Die auf vorstehend beschriebenem Wege über die chromatographische Bestimmung des Cystin-Cystein- und Methioningehaltes der einzelnen Hydrolysate errechneten S-Werte der Substrat-Eiweißfraktion betrugen zwischen 40–60, gelegentlich 80% der mittels der WURZSCHMITT-Methode erhaltenen, genauen Substrat-Eiweiß-S-Werte.

Obwohl nun die halb-quantitative papierchromatographische Bestimmungsmethode besonders der S-Aminosäuren sehr ungenau ist (vgl.

POLSON 1947), erschienen diese Differenzen doch zu hoch. Der Verdacht einer Bindung der SO_4'' aus den Substraten an die Substrat-Eiweißkörper schien berechtigt, da hierzu optimale Bedingungen in den Substraten vorlagen. So wird nach PAULI (1926), COHN (1943) und anderen Autoren die hohe H^+ -Konzentration und die Gegenwart recht beachtlicher Mengen von Alkohol in den Substraten eine SO_4'' -Bindung an die Substrat-Eiweißkörper stark fördern. Eine Störung der SO_4'' -Bestimmung (gravimetrische Bestimmung als BaSO_4) lag bestimmt vor, nur mußte das Ausmaß dieser Fehlerquelle noch genau bestimmt werden, was mit Hilfe ^{35}S markierter H_2SO_4 geschehen sollte (vgl. S. 237).

Glutathion konnte im Substrat der Stämme 1, 2 und 4285 in ähnlich großen Mengen nachgewiesen werden wie schon von RIPPPEL u. BEHR (1936). Bei den Stämmen 3, 5 und 6 fanden sich nur sehr geringe Mengen. Außerdem waren die erhaltenen Werte schlecht reproduzierbar. Ihre Streuung um den Mittelwert (4 Parallelkulturen) war so stark, daß die Störung der Bestimmungsmethode durch im Substrat dieser Stämme vorliegende unbekannte Verbindungen angenommen werden mußte. In diesen Fällen wurde dann auf die Durchführung der Bestimmung verzichtet. Tab. 3 zeigt das Ergebnis der Glutathionbestimmung bei 3 verschiedenen Stämmen.

Tabelle 3. *Glutathion-Bestimmungen*

Stamm	Alter der Kultur Tage	Glutathion in $\text{mg}/100\text{ cm}^3$
1	3	14,6
	6	11,2
	13	13,8
2	3	16,4
	6	9,2
	13	13,6
4285	3	11,4
	6	10,2
	13	12,5

Bestimmung freier SH-Gruppen

Nachdem im Verlaufe der bisher beschriebenen Untersuchungen Glutathion und Cystin-Cystein in den Substraten nachgewiesen worden waren, erschien es nötig, die Gesamt-SH-Gruppen-Konzentration zu bestimmen. Gerade dem in SH-Gruppen eingebauten S kommt ja im Ablauf vieler Stoffwechselvorgänge erhöhte Bedeutung zu, nicht nur bei der starken aeroben Alkoholbildung, auch bei dem Aufbau und Abbau der Eiweißkörper selbst (s. LEHNARTZ-FLASCHENTRÄGER). Abb. 7 zeigt die Substrat-SH-Gruppenkonzentration zweier Stämme in jeweils 5 verschiedenen Wachstumsstadien. Der starke Anstieg des SH-Gruppen-S im Frühstadium des aktiven Wachstums ist im Zusammenhang mit der intensiven Alkoholbildung im gleichen Zeitabschnitt besonders interessant (vgl. ROBOTNOWA 1949).

Es mußte nun versucht werden, möglichst alle SH-Gruppen tragenden in den Substraten vorliegenden Verbindungen qualitativ zu erfassen. Es kamen ja hier sehr

viele S-organische Verbindungen in Frage, die im Verlaufe der Substrataufarbeitung wegen ihrer leichten Flüchtigkeit oder zum Beispiel durch Adsorption an die relativ großen Mengen der zu Beginn der Aufarbeitung in den Substraten ausgefällten BaSO_4 -Niederschläge verloren gegangen sein konnten.

Der Versuch tiefer (bis $+130^\circ$) siedende S-organische Verbindungen durch fraktionierte Destillation aus den Rohsubstraten abzutrennen und mittels geeigneter Reagentien nachzuweisen, ergab jedoch, daß weder Mercaptane, Thioäther noch Schwefelsäureester vorliegen können. Das Vorkommen letzterer wurde außerdem

noch in einem gesonderten Versuch (saure Verseifung vgl. auch RIPPEL u. BEHR 1936) geprüft und völlig einwandfrei festgestellt, daß diese Verbindungen auf keinen Fall in den Kultursubstraten vorliegen können. Ebenso verliefen Versuche, wasserdampfppflüchtige S-organische Verbindungen aus den Substraten durch Wasserdampfdestillation abzutrennen, negativ.

Sowohl die fraktionierte als auch die Wasserdampfdestillation mußten vorzeitig abgebrochen werden, da aus den Rohsubstraten der Stämme 4285, 29, 2, 3 und 4 bei etwa $125-145^\circ\text{C}$ (bzw. nach 30 min Durchleiten von überhitztem Wasserdampf) beträchtliche Mengen H_2S entwichen, während gleichzeitig Brenztraubensäure und NH_3 ins Destillat mit übergingen. Ging den Destillationen jedoch eine Ausfällung und Abtrennung der gesamten SO_4^{2-} und SO_3^{2-} in den Kultursubstraten voraus, so traten die oben angeführten Verbindungen erst dann in die Destillate über, wenn die Substrate fast bis zur Trockne eingengt waren. Sie dürften dann das Ergebnis einer Pyrolyse gewesen sein. Im Verlaufe der Wasserdampfdestillation traten sie dann überhaupt nicht mehr auf.

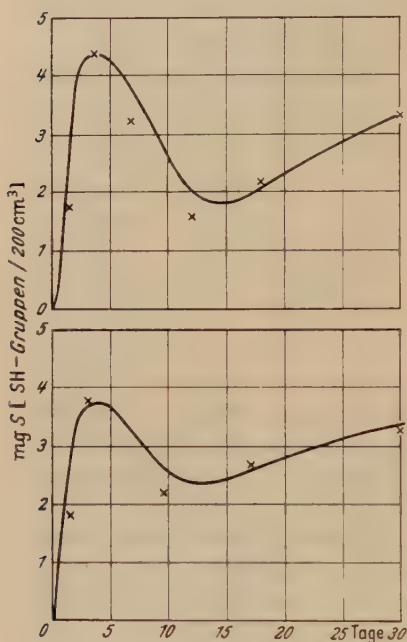


Abb. 7. SH-Gruppenkonzentration in den Substraten zweier Stämme von *Asp. niger*

Diese Feststellungen lassen den Schluß zu, daß die SO_4^{2-} oder SO_3^{2-} irgendwie an diesem Vorgang beteiligt sind. Zieht man die Reaktionsprodukte (H_2S , Brenztraubensäure und NH_3) in Betracht, so fällt auf, daß diese beim enzymatischen Abbau zum Beispiel des Cystins (Cystein-Desulfurase) ebenfalls auftreten (vgl. RIPPEL-BALDES 1955 und BINKLEY 1943). Cystein-Cystin ist, wie die papierchromatographische Eiweißuntersuchung ergeben hatte, in allen Kultursubstraten vorhanden. Trotzdem braucht aber im vorliegenden Falle wegen des Eiweißcharakters der Enzyme, auch der Cystein-Desulfurase (Hitze-Denaturierung), mit fermentkatalytischer Einwirkung sicherlich nicht mehr gerechnet zu werden. Es erscheint so sehr wahrscheinlich, daß eine Cystin-Spaltung, wie sie SCHÖBERL (1940) beschrieben hat, vorlag. Nach diesen Untersuchungen werden Disulfidbrücken bei Einwirkung von Cyaniden, Sulfiten oder Sulfiden gespalten.

Die intermediär entstehende Cysteinsulfosäure ist metastabil und zerfällt in Brenztraubensäure, H_2S und NH_3 .

Da zum Aufbau der S-haltigen Aminosäuren eine Reduktion des $\text{SO}_4^{\prime\prime}\text{-S}$ unbedingt erforderlich ist, die ohnehin über SO_3^{\prime} als Zwischenstufe vor sich geht, fällt die Vorstellung leicht, daß im Moment des Eintretens der Reaktion genügend SO_3^{\prime} im Substrat enthalten waren, um diesen Abbau zu ermöglichen. Sollte es sich wirklich um derartige Spaltungsvorgänge handeln, so muß möglicherweise mit kleineren S-Verlusten im Verlaufe des Substrataufarbeitungsganges, ja vielleicht sogar während der Kultivierungsdauer im Brutraum gerechnet werden. Es ergibt sich so eine Fehlerquelle, die zu niedrige S-Werte innerhalb der S-Bilanzen zum Teil erklären könnte.

Die zweite größere Fehlermöglichkeit bestand nun allerdings nicht nur, wie vorstehend erwähnt, in einer etwaigen Adsorption S-organischer Verbindungen an die BaSO_4 -Niederschläge im Verlaufe der Gesamt- $\text{SO}_4^{\prime\prime}$ -Abtrennung aus den Substraten. Manche S-organische Verbindungen, wie z. B. Chondroitin- und Mucoitinschwefelsäure sowie Heparin, bilden mit Ba^{++} ebenfalls schwer lösliche Salze. Da die beiden erstgenannten Verbindungen bereits im schwach sauren Bereich unter vollständiger Abgabe ihrer Schwefelsäurereste verseift werden, konnten sie im Gegensatz zu Heparin eine derartige Störung kaum hervorrufen. Weiterhin wurden Versuche vorgenommen, gegebenenfalls adsorbierte oder mitausgefällte Verbindungen durch Extraktion der BaSO_4 -Niederschläge mit dest. Wasser und einer Reihe anderer Lösungsmittel abzutrennen. Die durch Einengen im Vacuum und völligen Wassereinsatz im Exsiccator über P_2O_5 erhaltenen sehr geringen Rückstände aus den Extrakten enthielten jedoch nur kaum nennenswerte Spuren organischer Substanz. Vor der Extraktion mit lauwarmem Wasser gut gewaschene BaSO_4 -Niederschläge enthielten keinerlei organische Substanz mehr. Hinweise auf die Gegenwart von Heparin in den Substraten ergaben sich in keinem Falle.

Acetonfällbare Fraktion

Erschwerend bei der Aufstellung von S-Bilanzen mußte auch die Tatsache wirken, daß aus den Substraten von Standkulturen aller Untersuchungsstämme mittels Aceton eine zwar mengenmäßig geringe, aber stark S-haltige Fraktion ausgefällt werden konnte, über deren Zuordnung zu einer bestimmten Klasse chemischer Verbindungen noch nichts Genaueres ausgesagt werden konnte. Die Fällung wurde im stark eingengten Filtrat der Eiweißfällung unter Zufügen größerer Acetonmengen erreicht. Nähere Untersuchungen dieser Fraktion wurden im Isotopenversuch vorgenommen (s. S. 238).

2,4-Dinitrophenylhydrazon-Fällung

Außer den durch die Acetonfällung erfaßten unbekannten S-organischen Verbindungen gelang noch die Abtrennung C=O -Gruppen und S enthaltender, nicht näher bekannter Verbindungen aus den Substraten mittels Fällung durch 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Durch dieses Reagens werden alle Keto- und Aldehydgruppen enthaltenden Verbindungen meist schon im Moment der Zugabe kristallin als 2,4-Dinitrophenylhydrazone gefällt. Die S-Gehaltsbestimmung nach Oxydation in der Nickelbombe zeigte bei allen untersuchten Stämmen einen relativ hohen S-Gehalt der Rohhydrazonfällungen an.

Den Versuchen der Auftrennung dieser Fraktionen in definierte Einzelkomponenten mußte eine gute Reinigung der Niederschläge durch Rekristallisation vorausgehen. Die Löslichkeit der Hydrazonfraktion sämtlicher Untersuchungsstämme und in allen Wachstumsstadien ließ keine deutlichen Unterschiede erkennen. Sie waren in Methanol, Äthanol und Aceton vollständig und gut löslich, während sich in Benzol nur etwa ein Drittel der Gesamtmenge löste. Die Benzol-lösliche Unterfraktion war stets blutrot, die äthanolische orange-braun gefärbt.

Zur weiteren Untersuchung erschien es nun zweckmäßig, die Rohhydrazon-Niederschläge zunächst im Soxhletapparat mit Benzol so lange zu extrahieren, bis das Lösungsmittel farblos überging, und den unlöslichen Anteil anschließend vollständig in Äthanol aufzulösen. Die weitere Trennung der so erhaltenen Fraktionen wurde säulenchromatographisch vorgenommen und die S-haltigen Verbindungen im Isotopenversuch bei unverändertem Aufarbeitungsgang abgetrennt (vgl. S. 240).

Da nun von Anfang an die Absicht bestand, im Substrat von *Asp. niger*-Kulturen enthaltene S-organische Verbindungen möglichst vollständig abzutrennen, um die zu einer Identifizierung nötigen chemischen Untersuchungen durchführen zu können, mußte auch versucht werden, die S-haltigen Fraktionen in möglichst großen Mengen zu gewinnen. Dies war zum Teil schon durch die Auffindung geeigneter Abtrennungsmethoden (Fällung als 2,4-Dinitrophenylhydrazone und Acetonfällung) gelungen. Auch lieferten die nach einem experimentell genau ermittelten Substrataufarbeitungsgang aufzustellenden S-Bilanzen in verschiedenen Wachstumsstadien Hinweise für den zur präparativen Abtrennung der Einzelfractionen mit größter Ausbeute geeignetsten Zeitpunkt im Wachstumsverlauf der Kulturen.

Anwendung von ^{35}S markierter Schwefelsäure

Nachdem durch das Ergebnis der vorstehend beschriebenen Anreicherungsversuche der Weg zu einer präparativen Gewinnung der Substrateinzelfractionen gefunden war, mußte nun noch versucht werden, die im Rahmen der gesamten Untersuchungen unbeantwortet gebliebenen Fragen und Probleme zu lösen. Es handelte sich hauptsächlich um die $\text{SO}_4^{''}$ -Bindung an die Substrat-Eiweißkörper und die damit verbundene Störung der $\text{SO}_4^{''}$ -Bestimmung und der des Substrat-Eiweiß-S-Gehaltes, sowie die Identifikation der S-haltigen Komponenten der adsorptionschromatographisch getrennten 2,4-Dinitrophenylhydrazon-Fraktion und eine genauere Untersuchung des mit Aceton fällbaren Substratanteils.

Die weitestmögliche Klärung dieser Fragen war in erster Linie auch zur Aufstellung genauer S-Bilanzen in verschiedenen Wachstumsstadien erforderlich und die entsprechenden Untersuchungen wurden nun in

Isotopenversuchen unter Verwendung von ^{35}S -markierter H_2SO_4 durchgeführt.

Die Verwendung dieses radioaktiven Indicators mußte bei der Aufarbeitung der Substrate für die vollständige Erfassung der S-haltigen Fraktionen eine größere Genauigkeit gewährleisten. In den vorangegangenen Untersuchungen war es oft nicht möglich, S-Gehaltsbestimmungen durchzuführen, da die aus Niederschlägen isolierten Einzelfraktionen so gering waren, daß die Genauigkeit der gravimetrischen Bestimmungsmethoden nicht ausreichte. Die Isotopenmethode gestattet hingegen noch die Erfassung praktisch gewichtsloser Mengen. Sie erlaubt eine Überprüfung der Vollständigkeit und Güte der bisher im Aufarbeitungsgang angewandten Trennungsv erfahren und bewährte sich besonders bei den Untersuchungen der Eiweiß-Hydrazon- und Acetonfraktion. Die Untersuchung der $\text{SO}_4^{''}$ -Bindung an die freien NH_2 -Gruppen der Substrat-Eiweißkörper konnte rasch und sehr genau ausgeführt werden.

Obwohl über die Toleranzdosen bei *Aspergillus niger* noch keine näheren Angaben vorliegen, so ist doch auf keinen Fall eine strahlungsbedingte Änderung des Stoffwechsels bei diesem Organismus anzunehmen. Zahlreiche Untersuchungen über die Strahlenwirkung auf die sehr viel empfindlicheren Bakterien rechtfertigen diese Annahme. Als Beispiel sei angeführt, daß beim vollständigen Zerfall von $1\ \mu\text{C } ^{32}\text{P}$ in 1 g Wasser, Gewebe oder auch Bakterien, etwa 900 Röntgen an der Stelle erzeugt werden. $1\ \mu\text{C } ^{32}\text{P}$ müßte also etwa ein halbes Jahr an dieser Stelle verbleiben, damit sich dort diese Dosis ansammelt (vgl. HOLLAENDER 1954 und FORSSBERG 1943). Nach etwa 1000 Röntgen zeigen einige Bakterien bereits morphologische Veränderungen. Um die Hälfte von *Bacterium coli* abzutöten, benötigt man jedoch 5000 Röntgen.

Irgend eine Beeinflussung des niederen Stoffwechsels oder des Eiweißstoffwechsels konnte bei diesen Organismen allerdings auch dann noch nicht beobachtet werden. Es ist bekannt, daß die Toleranzdosen für die Stoffwechselbeeinflussung über die verschiedenen Fermentketten sehr unterschiedlich liegen. Sie können zwischen 1000 und einigen Millionen Röntgen schwanken.

Zieht man nun in Betracht, daß die bei den angeführten Untersuchungen ermittelten Werte für ^{32}P gelten, so erscheint eine Beeinflussung der Stoffwechselvorgänge durch die geringere Strahlungsenergie der ohnehin kleinen angewandten ^{35}S -Dosen kaum annehmbar. Vergleichsweise liegt die Energie der Partikelstrahlung für ^{32}P bei $\beta^- = 1,69\ \text{meV}$, während die wesentlich schwächere von ^{35}S bei $0,167\ \text{meV}$ liegt. Strahlungsschemische Effekte, wie etwa die Bildung von H_2O_2 oder echter Peroxyde im Substrat, sind demnach auch nicht anzunehmen.

Befürchtungen in bezug auf irgendwelche Veränderungen des Stoffwechselgeschehens, bedingt durch Strahleneinwirkung, können demzufolge bei den durchgeführten Untersuchungen als unbegründet ausgeschlossen werden. Ebenso gering war die Gefahr eines unphysiologischen S-Austausches innerhalb der einzelnen Moleküle. Diese Erscheinung wäre allerdings für die angestrebten Untersuchungsziele größtenteils ohne Bedeutung gewesen.

Die verwendete Zählordnung registrierte bei einem $\text{Ba}^{35}\text{SO}_4$ -Niederschlag, gewonnen aus $2\ \text{cm}^3$ Substrat der unbeimpften Nährlösung, 41052 Impulse/Minute. $1,5\ \text{mC } ^{35}\text{S}$ wurden 1 l Nährlösung III zugefügt. Es wurde also nicht trägerfrei gearbeitet. Die Selbstabsorption wurde bei allen Messungen der $\text{Ba}^{35}\text{SO}_4$ -Niederschläge voll berücksichtigt.

³⁵SO₄''-Bindung an Substrateiweiß

Die Bestimmung wurde in 3 verschiedenen Wachstumsabschnitten vorgenommen. In Reihe A wurde das Gesamt-SO₄' vor der Eiweißabtrennung ausgefällt und gemessen, während in Reihe B in umgekehrter Reihenfolge verfahren wurde. Im einzelnen sind die Versuche im methodischen Teil dieser Arbeit ausführlich beschrieben worden.

Tabelle 4. SO₄'-Bindung an Substrateiweiß

Alter der Kulturen in Tagen	Stamm	SO ₄ '-Bindung in % des Gesamt-SO ₄ '	pH
5	I 1	Reihe A: 7,5	3,2
		6,0	2,8
	4285	8,8	3,6
12	II 1	11,0	2,4
	2	17,0	1,9
	4285	19,6	1,5
18	III 1	22,0	3,1
	2	25,0	2,6
	4285	28,4	2,2
5	I 1	Reihe B: 11,9	3,2
	2	4,3	2,8
	4285	5,9	3,6
12	II 1	21,3	2,4
	2	34,2	1,9
	4285	27,5	1,5
18	III 1	31,4	3,1
	2	55,2	2,6
	4285	57,2	2,2

Tab. 4 enthält die Prozentwerte des an Eiweiß gebundenen SO₄'-S. Die Gesamtmenge des zugefügten markierten ³⁵SO₄' wurde hierbei gleich 100 gesetzt. Der Gehalt der Eiweißfraktion an ³⁵S wurde nach Aufschluß in der WURZSCHMITT-Bombe und anschließender SO₄'-Fällung durch Messung der Aktivität der BaSO₄-Niederschläge ermittelt. Zerfallsrate, Selbstabsorption und Nullratenschwankung wurden hierbei genau wie bei den übrigen Versuchen ebenfalls berücksichtigt. Das Ergebnis zeigt deutlich, daß das im Substrat in gelöster Form vorliegende Eiweiß große SO₄'-Mengen zu binden vermag, daß also die Abtrennung des Gesamt-SO₄'-S der Substrate unbedingt vor der Eiweißabtrennung erfolgen muß. Die großen Niederschlagsmengen der Phosphorwolframsäurefällung bedingen durch Adsorption und Einschluß zusätzliche hohe SO₄'-Verluste. Mehrfache Wiederholung dieser Versuche an verschiedenen Kulturen (Parallelkulturen) der gleichen Stämme zeigte eine völlige Übereinstimmung der Werte lediglich bei gleichaltrigen Kulturen. Im Verlauf des

normalen Wachstums folgt die SO_4' -Bindung, wie zu vermuten war, der pH -Kurve. Die SO_4' -Bindung erreicht ihr Maximum im Stadium der höchsten H^+ -Konzentration des Substrats. Die Untersuchungen wurden in den gleichen Wachstumsabschnitten wie die zur Aufstellung der S-Bilanzen an den Stämmen 1, 2 und 4285 vorgenommen.

*Bestimmung des S-Gehaltes der Substrat-Eiweißfraktion
nach Beseitigung der gebundenen $^{35}\text{SO}_4''$)*

Nun mußte versucht werden, die gebundenen $^{35}\text{SO}_4'$ -Ionen von den Eiweißkörpern abzutrennen, da die $^{35}\text{SO}_4'$ -Bindung als ausgesprochen unphysiologischer Prozeß die wirklichen Verhältnisse beim eigentlichen S-Umsatz durch *Asp. niger* nur verschleiern kann.

Versuche mit Dialyse. Zunächst wurde versucht, die gebundenen SO_4' -Ionen durch Dialyse (Kollodiumhülle) von den durch Hitzeoagulation gewonnenen Substrateiweißkörpern bzw. von den Eiweißphosphorwolframsäure-Niederschlägen abzutrennen. Dialysiert wurde hierbei eine Aufschlämmung in Salzsäure-Natriumborat-Puffer bei pH 7,7 gegen dest. Wasser von 20°C .

In diesem Bereich liegen Aminosäuren als Zwitterionen vor, und die Bedingungen zur Abspaltung der gebundenen $^{35}\text{SO}_4'$ -Ionen müssen optimal sein. Die Ergebnisse dieses Versuchs befriedigten jedoch nicht. Einmal war die Dialysendauer sehr lang (12—14 Std je 500 mg Eiweiß), und dann waren die zu dialysierenden Niederschlagsmengen (Eiweißphosphorwolframsäurefällung) sehr groß (3—6 g). Auch konnte in den Hydrolysaten der durch Dialyse gereinigten Substrat-Eiweißfraktionen noch $^{35}\text{SO}_4'$ nachgewiesen werden, was eine unvollkommene SO_4' -Abtrennung nach dieser Methode nachwies.

Zur vollständigen Abtrennung und Beseitigung der gebundenen $^{35}\text{SO}_4'$ erwies sich eine in der Radiochemie häufig in ähnlich gearteten Fällen angewendete Methode als brauchbar. Sie sei im folgenden näher beschrieben.

$^{35}\text{SO}_4'$ -Abtrennung über chemischen Austausch gegen SO_4'' . Dieses Verfahren konnte angewendet werden, da bei den Bestimmungen des S-Gehaltes der Substrateiweißfraktion (Aufschluß nach WURZSCHMITT, Fällung als $\text{Ba}^{35}\text{SO}_4$ und direkte Messung dieses Niederschlags unter dem Glockenzählrohr) durch Aktivitätsmessung ja lediglich ^{35}S erfaßt wird.

Die Eiweißphosphorwolframsäure-Niederschläge wurden vollständig in $\text{n}/10 \text{H}_2\text{SO}_4$ (50 cm^3 je 500 mg Eiweiß) aufgeschlämmt und unter Rühren (Magnetrührer) 5 bis 10 Std bei Zimmertemperatur stehengelassen. In dieser Zeitspanne vollzog sich ein fast vollständiger Austausch der gebundenen $^{35}\text{SO}_4'$ -Ionen gegen die inaktiven SO_4'' -Ionen der Austauschlösung. Aus den Hydrolysaten von Substrat-Eiweiß-Fractionen, die nach diesem Verfahren behandelt worden waren, konnte jedenfalls kein ^{35}S -aktives BaSO_4 mehr ausgefällt werden.

Um nun absolut $^{35}\text{SO}_4''$ -freies Eiweiß für die Bestimmung der reinen Aminosäure-S der Substrateiweißfraktionen zu gewinnen, wurden beide angeführte Methoden miteinander kombiniert. Durch Dialyse gereinigtes Substrateiweiß wurde also außerdem noch über die Methode des chemischen Austausches von gebundenem $^{35}\text{SO}_4'$ befreit, gut getrocknet und der $\text{Ba}^{35}\text{SO}_4$ -Messung unter dem

Zählrohr nach vorheriger Oxydation (WURZSCHMITT-Bombe) und Fällung mit BaCl_2 zugeführt. Die so erhaltenen Werte mußten den Genauigkeitsansprüchen einer quantitativen Bestimmungsmethode genügen und außerdem einwandfrei die vom Pilz aktiv umgesetzten $^{35}\text{SO}_4$ -Mengen, soweit der ^{35}S des $^{35}\text{SO}_4$ jedenfalls ins Substrateiweiß eingebaut wurde, zeigen.

Der prozentuale Gehalt der Substrateiweißkörper an ^{35}S in den verschiedenen Wachstumsstadien war bei fast allen untersuchten Stämmen ähnlich hoch. Abb. 8 zeigt die bei Stamm 1 gefundenen Verhältnisse.

Die autoradiographische Untersuchung der Substrat-Eiweißkörper (Papierelektrophorese und Papierchromatographie) bestätigte die Be-

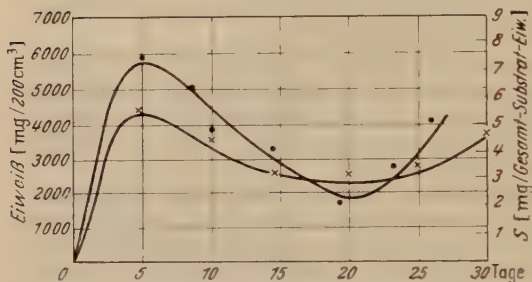


Abb. 8. Substrat-Eiweiß-S-Gehalt und Substrat-Eiweiß-Bildung bei Stamm 1. • Eiweiß-Bildung, × Eiweiß-S-Gehalt

funde der vorangegangenen Untersuchungen an inaktivem Substrat-Eiweiß auf diesem Gebiet vollständig. Insbesondere fanden sich auch hierbei außer Cystin und Methionin keine anderen S-haltigen Aminosäuren.

Acetonfällung

Da alle Versuche mit ^{35}S als Leitisotop im Standardkulturverfahren ausgeführt wurden, mußte im Aufarbeitungsgang zwischen Eiweiß- und Hydrazonfällung eine Acetonfällung eingefügt werden. Die außerordentlich stark S-haltige Fraktion konnte nur auf diesem Wege abgeschieden werden. Die so erhaltenen Fällungsniederschläge waren mengenmäßig sehr gering, etwa 100–150 mg/500 cm³ (vgl. S. 233), enthielten jedoch sehr große S-Mengen. Die Farbe der Niederschläge war kurz nach ihrer Abtrennung durch Filtration über Membranfilter rosa-violett, verblaßte jedoch nach längerem Trocknen an der Luft und im Exsiccator zusehends, so daß sie nach etwa einer Woche bis 14 Tagen fast weiß erschienen. Wurden sie im Wasser aufgeschlämmt und mit einem Reduktionsmittel, etwa Na_2SO_3 , versetzt, so nahmen sie wieder ihre rosa-violette Farbe an, die jedoch nach erfolgter Abtrennung und Trocknung an der Luft auch wieder verschwand. Zieht man in Betracht, daß Phosphorwolframsäure, die ja auch nach der Eiweißabtrennung noch im Substrat enthalten war, mit SH-Gruppen eine intensive Blaufärbung ergibt, die nach längerer O_2 -Einwirkung, also an der Luft, ebenfalls stark verblaßt, so liegt die Vermutung nahe, daß der Niederschlag S in Form von SH-Gruppen enthält. Die erwähnte Eigenschaft der Phosphorwolframsäure wird auch vielfach zur quantitativen Bestimmung von SH-Gruppen nach KAMENOSUKE SHINOHARA (1935) herangezogen.

Die anfängliche Vermutung, es könnten S-haltige Eiweißkörper vorliegen (zufolge der äußerst geringen Mengen, um die es sich handelte, konnte leider keine quantitative N-Bestimmung ausgeführt werden; der qualitative Nachweis für N konnte jedoch erbracht werden), konnte experimentell nicht gefestigt werden. Versuche, die Niederschläge mittels der gebräuchlichen Hydrolysemethoden der Eiweißchemie in einzelne Aminosäuren zu spalten, zeitigten keinen Erfolg. Da die anschließende papierchromatographische Untersuchung lediglich eine normalerweise der Melanoidinfraction in Farbe und R_f -Wert vergleichbare Zone nachwies, könnte es sich vielleicht um Schleimstoffe von z. B. Mucoitincharakter handeln, die nach TAKAHATA (1924) leicht dazu neigen, mit Eiweiß basischer Überschußladung, wie es in den Substraten ja vorliegt, schwer lösliche, salzartige Verbindungen einzugehen. Der hohe Kohlenhydratanteil dieser Verbindungen würde dann ohne Zweifel im Falle einer HCl-Hydrolyse die vollständige Zerstörung der gleichzeitig vorhandenen Protein-Aminosäuren und ihre Überführung in Humine bewirken (vgl. KOFRANY 1951, 1955; NEUBERG 1927; SHIRO AKABORI 1933). Auch diese Vermutung konnte allerdings nicht experimentell gefestigt werden.

Durch enzymatische Hydrolyse könnte in diesem Falle vielleicht Klarheit geschaffen werden. Beachtenswert ist, daß die durch Aceton fällbare Fraktion in den Anfangsstadien des aktiven Wachstums der Kulturen anscheinend nicht im Substrat enthalten ist. In diesen Wachstumsabschnitten trat jedenfalls keine Ausfällung ein. Der Fällungsvorgang selbst wurde in den auf 20–40 cm³ eingengten Filtraten der Eiweißfällung vorgenommen. Die Niederschlagsbildung trat erst nach Zusatz von 20 cm³ fast wasserfreiem Aceton auf. Sie war flockig und nach dem Trocknen feinpulvrig, unlöslich in Wasser und organischen Lösungsmitteln. Eine mit Wasser aus dem rosa-violetten Niederschlag hergestellte Suspension wanderte im Chromatogramm bei Verwendung von Butanol-Eisessig als Lösungsmittel sehr schnell (etwa R_f -Werte des Methionins), war jedoch mit Ninhydrin nicht anfärbbar. Die schwache Eigenfarbe des Niederschlags blieb jedoch erhalten.

Hydrazone

Diese Fällung verlief genau auf bereits beschriebene Weise. Da die Fällungen ³⁵S-aktiv waren, bestand Aussicht, die Ergebnisse der säulenchromatographischen Trennungsgänge zu überprüfen, vor allem die einzelnen Zonen auch ohne vorherige Oxydation des enthaltenden S zu SO₄'' in der Nickelbombe direkt unter dem Zählrohr zu messen. Um eine wirklich vollständige Abtrennung der Keto- und Aldehydgruppen enthaltenden organischen S-Verbindungen durch Fällung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu erreichen, konnte Aceton vor der Fällung als Träger zugesetzt werden. Meist war dies unnötig, da die Substrate von der

vorhergehenden Acetonfällung her noch große Mengen dieser Verbindung enthielten. Auch bei diesen Versuchen fielen die dunkelroten Anteile des Niederschlags, also die S-reichste Fraktion, erst nach starkem Einengen des Reaktionsgemisches im Vakuum aus. Die Niederschläge wurden in Benzol- und Äthanolfraktionen aufgeteilt und wie beschrieben an saurem

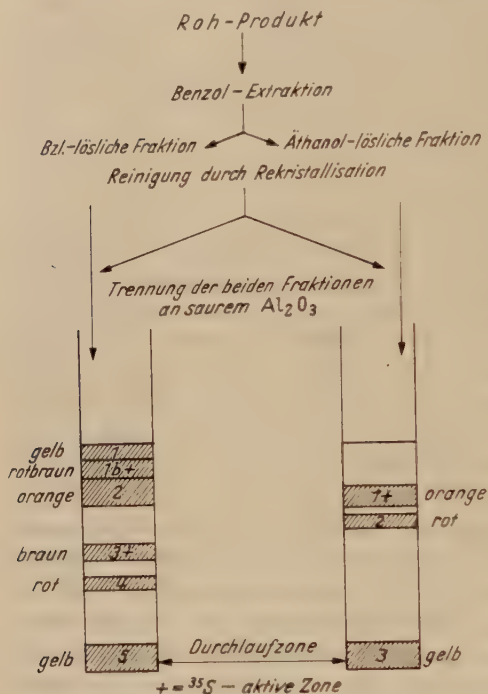


Abb. 9. Aufarbeitungsschema (Hydrazonfraktion)

nisse der vorhergehenden Untersuchungen auf diesem Gebiet nur bestätigt wurden. ^{35}S -aktiv war ein orange-farbenes Hydrazon der Benzol-fraktion, während eine rotgefärbte Verbindung dieser Fraktion nur sehr schwach aktiv war, wobei der Verdacht einer Verunreinigung in diesem Falle immerhin angenommen werden konnte. Der Äthanol-lösliche Anteil der Gesamt-Hydrazonfraktion enthielt eine stark aktive, gelb-orange-farbene Komponente.

Mit Hilfe der Aktivitätsmessung konnten also mit Sicherheit zwei verschiedene S- und C=O-Gruppen im Molekül enthaltende Einzelverbindungen festgestellt werden. Es wurde stets folgendes Aufarbeitungsschema (Abb. 9) eingehalten.

Wie S. 232 ausgeführt wurde, unterliegen die Substrat-Eiweißkörper, besonders in 20%iger Glucoselösung, schon bei Zimmertemperatur

Aluminiumoxyd verdrängungs-chromatographisch an der Säule getrennt.

Ein Versuch, die Einzel-fractionen in kleinen Filter-papierstückchen aufzusaugen und diese nachscharfem Trocknen direkt unter dem Zählrohr zu messen, lieferte keine befriedigenden Ergebnisse. Die noch meßbare relative Aktivität war nach Verstreichen einer ganzen Halbwertzeit zum Zeitpunkt der Messung schon zu gering, um genauere Aktivitätsmessungen noch zuzulassen. Die Bestimmung des prozentualen S-Gehaltes der einzelnen Zonen konnte deshalb nicht mehr vorgenommen werden. Sie lieferte lediglich noch qualitative Werte, durch welche die Ergeb-

tiefgreifenden oxydativen Spaltungsvorgängen, in deren Verlauf aus den einzelnen Aminosäuren die jeweils um 1 C-Atom ärmeren Aldehyde entstehen. Diese werden nun bei der Fällung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin mit ausgefällt.

SCHÖBERL (1940) untersuchte (vgl. S. 63) z. B. die Cystinspaltung durch Cyanide, Sulfit und Sulfide. Er fand ein metastabiles, S-haltiges Spaltungszwischenprodukt, das von selbst in Brenztraubensäure, H_2S und NH_3 weiterzerfällt. Eigene Versuche (Abschnitt: papierchromatographische Untersuchung der Substrat-Eiweißfraktion) zeigten, daß Cystin durch Glucose leicht unter H_2S -Entwicklung gespalten wird. Obwohl nun keine näheren Untersuchungen über die oxydative Veränderung, besonders die hierbei auftretenden Zwischenprodukte der S-Aminosäuren vorliegen, so liegt doch die Vermutung nahe, daß bei der 2,4-Dinitrophenylhydrazinfällung solche, vielleicht S-haltige Aminosäurespaltprodukte mit erfaßt wurden. Sie würden sich dann aber eher von Methionin als von Cystin ableiten, da die S-haltigen Spaltprodukte der letzteren Verbindung sehr instabil zu sein scheinen und durch ihren Zerfall frei werdender H_2S entweicht (vgl. Abschnitt: papierchromatographische Untersuchungen). Während beim Erwärmen von Cystin in 20%iger Glucoselösung H_2S entweicht, konnte dies bei Methionin unter den gleichen Bedingungen nicht beobachtet werden.

Jedenfalls müßte diese Entstehungsmöglichkeit für die S-haltigen, durch 2,4-Dinitrophenylhydrazin fällbaren Verbindungen bei späteren, rein chemischen Untersuchungen im Auge behalten werden.

Schwefelbilanzen

Methodisches

Die Bestimmung der ^{35}S -Aktivität als Maß des Mycel-, Substrat- und Hydrazon-S-Gehaltes (auch der Acetonfraktion) wurde stets durch direkte Messung von $BaSO_4$ -Niederschlägen (der Fällung ging also stets ein oxydativer Aufschluß in der WURZSCHMITT-Bombe voraus) bekannten Gewichtes je Fläche des Meßpräparates (mg/cm^2), unter dem Glockenzählrohr durchgeführt. Die Bestimmung des Präparatgewichtes je Flächeneinheit war wegen der Ermittlung und Berücksichtigung der Selbstabsorption der Niederschläge erforderlich. Da die allgemeine Untersuchungsmethodik im methodischen Teil der vorliegenden Arbeit genau beschrieben wurde, sei hier lediglich noch auf Vorkehrungen hingewiesen, die zur Vermeidung falscher Meßergebnisse, hervorgerufen durch Adsorption von ^{35}S -haltigen Verbindungen, insbesondere $^{35}SO_4^{--}$ an dem Eiweißphosphorwolframsäure-Niederschlag, getroffen wurden.

Die Befreiung des Mycels von anhaftenden $^{35}SO_4^{--}$ -Ionen konnte mit Hilfe chemischer Austauschvorgänge erreicht werden. Da nur ^{35}S bei den Messungen erfaßt wurde, konnte das sauber mit dest. Wasser gewaschene Mycel in $n/10$ H_2SO_4 eingelegt und mehrere Stunden (5—8 Std bei etwa $25^\circ C$) aufbewahrt werden. Im Verlaufe dieser Zeitspanne ist unbedingt mit einem fast vollständigen Austausch der adsorbierten $^{35}SO_4^{--}$ gegen SO_4^{--} -Ionen zu rechnen. So konnten sehr genaue Werte bei der nun folgenden Bestimmung des Mycelschwefelgehaltes erhalten werden. Die

Aktivität der Austauschlösung war so gering, daß mit nennenswerten Mengen am Mycel äußerlich festhaftenden $^{35}\text{SO}_4^{--}$ bestimmt nicht gerechnet werden kann. In ähnlicher Weise wurde mit den Niederschlägen der Phosphorwolframsäure-Trichlor-

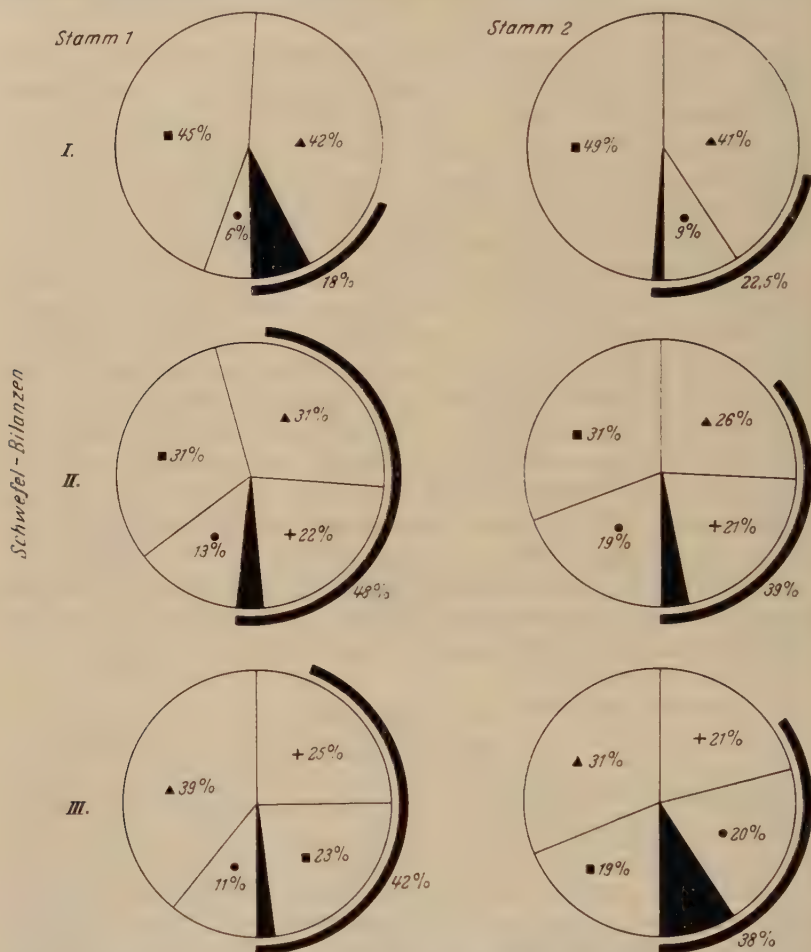


Abb. 10. Die Darstellung zeigt die Aufteilung der nicht mehr als BaSO_4 fällbaren S-Mengen bei 3 Stämmen in drei verschiedenen Wachstumsstadien, I (5 Tage), II (12 Tage), III (18 Tage). Die jeweilige Gesamt- SO_4^{--} -Abnahme wird gleich 100 gesetzt und durch gleichgroße Kreise dargestellt. — Die den Kreisperipherien streckenweise parallel laufenden dicken schwarzen Bogen drücken die prozentuale SO_4^{--} -Abnahme vom Gesamt- SO_4^{--} -Gehalt der unbeimpften Nährlösung aus, wenn die Kreisperipherie gleich 100% des ursprünglich in den unbeimpften Substraten enthaltenen Gesamt- SO_4^{--} bedeuten würde. — Der Glutathion-S-Gehalt wurde dem Eiweiß-S-Gehalt addiert und zusammen mit diesem dargestellt. — Die schwarzen Sektoren kennzeichnen die nicht nachgewiesenen S-Mengen, sind also wahrscheinlich größtenteils Ausdruck der jeweils im Verlaufe der Aufarbeitung auftretenden Fehler (Analytische Fehlerbreite) und deren Größe. — Aus der graphischen Darstellung sind die prozentualen S-Gehalte der Einzelfractionen (z. B. Mycel, Substrat-Eiweiß usw.) an S nicht ersichtlich. Sie wurden im Verlaufe von Einzeluntersuchungen festgestellt und sind in den entsprechenden Abschnitten der Arbeit angeführt. — In der Darstellung entspricht 1% = 0,2 mg S. ■ Mycel, ▲ Eiweiß in der Nährlösung, ● Hydrazone in der Nährlösung, ◐ Acetonfällung in der Nährlösung

essigsäurefällung verfahren. Nach Abtrennung der in Na_2SO_4 -Lösung aufgeschwemmten Niederschläge durch Filtration wurden diese gründlich mit dest. Wasser gewaschen und mit Aceton vorgetrocknet.

Zur Bestimmung des ^{35}S -Gehalts der Hydrazonfraktion wurde jeweils ohne Trägerzusatz in 25 cm^3 der Substrate mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin gefällt, stark eingeeengt und die so erhaltene Menge vollständig in der WURZSCHMITT-Bombe oxydiert und nach Fällung direkt als $\text{Ba}^{35}\text{SO}_4$ -Niederschlag gemessen.

Die Identifikation der ^{35}S -haltigen 2,4-Dinitrophenylhydrazone konnte allerdings wegen der kleinen Mengen der von den Säulen durch Trennung und Elution gewonnenen und durch Rekristallisation gereinigten Produkte nicht über die Oxydation und Fällung als $\text{Ba}^{35}\text{SO}_4$ und dessen Messung vorgenommen werden.

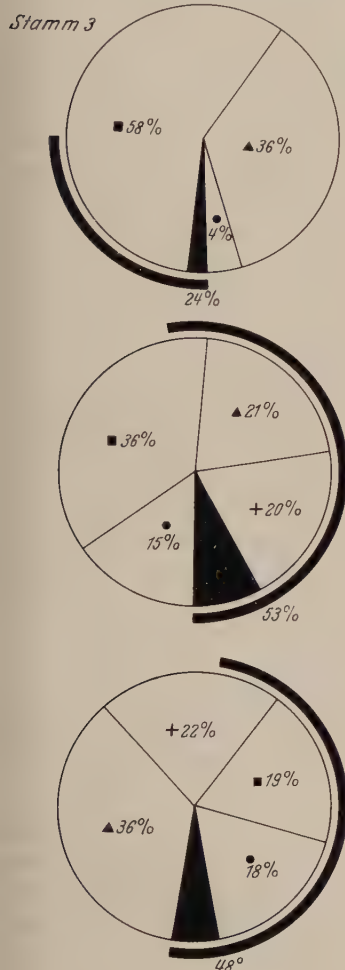
In diesem Falle wurden die Präparate (krist. Produkte) in unverändertem Zustand unter dem Zählrohr gemessen.

Ergebnis

Die schematische Darstellung in Abb. 10 zeigt die Aufteilung des nicht mehr aus den Substraten als BaSO_4 abtrennbaren S-Anteils. Der prozentuale S-Gehalt der einzelnen im Zuge des beschriebenen Kulturaufarbeitungsganges gewonnenen Fraktionen außer dem des Trockenmycels (vgl. S. 227) ist aus der schematischen Darstellung natürlich nicht ersichtlich. Da bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit als erstes Ziel der Nachweis des nicht mehr als BaSO_4 -fällbaren S und seine Aufteilung und Zuordnung zu einzelnen, genau definierten Fraktionen aus den

Kulturen angestrebt wurde, konnte auf Einzelangaben zugunsten einer besseren Übersicht verzichtet werden. Im folgenden sei jedoch trotzdem auf interessante Ergebnisse hinsichtlich der Verschiebung des Anteils der einzelnen Fraktionen am Gesamt-S im Verlaufe des Wachstums der Kulturen hingewiesen.

Mycel-S-Gehalt. Er beträgt im Endabschnitt des aktiven Wachstums etwa (Maximalwert) $0,25\text{--}0,3\%$ reinen S des Myceltrockengewichts. Mit beginnender Autolyse nimmt der prozentuale S-Gehalt sehr stark ab (S. 227).



Acetonfraktion. Der prozentuale S-Gehalt dieser Fraktion bleibt in allen Wachstumsstadien nahezu gleich hoch. Er bewegt sich bei den untersuchten Stämmen zwischen 2 und 12% des Trockengewichts.

Hydrazonfraktion. Ihr prozentualer S-Gehalt nimmt im Verlaufe des gesamten Wachstums stark zu. Er beträgt zu Beginn des aktiven Wachstums bei den untersuchten Stämmen etwa 1—2,5%, in der Endphase des aktiven Wachstums jedoch 3,6% und nimmt sogar im Anfangsstadium der einsetzenden Autolyse (bei Stamm 2 und 4285) noch um geringe Beträge zu (bis 8%). Frühere Untersuchungen (Anreicherungskulturen) lassen jedoch trotzdem darauf schließen, daß die S-Verbindungen dieser Fraktion bei fortschreitender starker Autolyse Zersetzungsvorgängen oder sonstigen starken chemischen Veränderungen ausgesetzt sind.

Substrat-Eiweiß-Fraktion. Der S-Gehalt wurde bereits (vgl. S. 230—231) in einem eigenen Abschnitt behandelt. Die bei der Aufstellung der S-Bilanzen auftretenden Differenzen (schwarze Sektoren) nicht nach gewiesenen Schwefels sind gering. Trotzdem brauchen sie nicht in jedem Falle auf gewöhnlichen Fehlerquellen analytischer Bestimmungen zu beruhen. Es ist möglich, daß sie zum Teil auch noch S-organische Verbindungen enthalten, die im Verlaufe der Untersuchungen sich einer Bestimmung entzogen und auch wegen ihres mengenmäßig geringen Auftretens nicht qualitativ festgestellt werden konnten.

Zusammenfassung

Die sehr weit, wenn nicht allgemein verbreitete Eigenschaft von *Aspergillus niger*-Stämmen, große $\text{SO}_4^{''}$ -Mengen aus den Nährsubstraten zu verarbeiten, wurde besonders im Hinblick auf die Bildung bisher noch nicht bekannter organischer S-Verbindungen im Substrat bei 6 verschiedenen Stämmen untersucht.

Neben der $\text{SO}_4^{''}$ -Verarbeitung wurden die pH-Verhältnisse, Wachstum, Substrat-Eiweißbildung, Säure- und Alkoholbildung im Kultursubstrat untersucht, sowie Atmungsmessungen vorgenommen. Einheitlich lagen bei fast allen untersuchten Stämmen die Maxima der $\text{SO}_4^{''}$ -Abnahme zeitlich vereint mit den Mycelgewichtsmaxima und der höchsten H^+ -Konzentration in den Substraten im gleichen Wachstumsabschnitt. Die Stämme mit stärkster Alkoholbildung zeigten auch die stärkste $\text{SO}_4^{''}$ -Verarbeitung, was an der hohen SH-Gruppenkonzentration, wie sie in den Substraten dieser Stämme nachgewiesen wurde, liegen könnte.

Die Untersuchung der Substrat-Eiweißbildung und die papierchromatographische und papierelektrophoretische Untersuchung dieser Fraktion wiesen in ihren Ergebnissen auf eine Störung der $\text{SO}_4^{''}$ -Abtrennung aus den Substraten und der S-Gehaltsbestimmung der Substrat-Eiweißfraktion durch Bindung dieser Ionen an die NH_2 -Gruppen der Eiweiß-

körper hin. Dies bestätigten Versuche mit ^{35}S -aktiver H_2SO_4 ; die dadurch bedingten Fehler konnten nach einem empirisch entwickelten Verfahren ausgeschaltet werden.

Die von RIPPEL u. BEHR bei *Aspergillus niger* im Kultursubstrat nachgewiesenen S-organischen Verbindungen konnten abgetrennt und näher beschrieben werden. Es handelt sich um Verbindungen, die außer S noch Carbonylgruppen im Molekül enthalten müssen, da sie mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin fällbar sind. Ihre durch Rekristallisation gereinigten Niederschläge konnten adsorptionschromatographisch getrennt werden.

Diese Fraktion enthielt mit Sicherheit zwei verschiedene S-enhaltende Verbindungen, während der S-Gehalt einer dritten Verbindung, die in kleineren Mengen vorhanden war, nicht mit ausreichender Sicherheit bestimmt werden konnte.

Mit Aceton konnten aus den Kultursubstraten, allerdings nicht aus solchen junger Kulturen, weitere S- und N-enhaltende organische Verbindungen ausgefällt werden, die jedoch nicht näher charakterisiert werden konnten.

Nach einem empirisch entwickelten Substrataufarbeitungsgang gelang die größtmöglich genaue Abtrennung der Einzelfractionen aus den Substraten nacheinander und die Aufstellung von S-Bilanzen bei jedem Stamm in jeweils 3 verschiedenen Wachstumsstadien durch Verwendung von ^{35}S -markiertem Sulfat als S-Quelle.

Herrn Prof. Dr. A. RIPPEL-BALDES danke ich für die Anregung zur Durchführung vorliegender Arbeit und seine wertvollen Ratschläge, desgleichen Herrn Prof. Dr. SEELMANN-EGGEBERT/Mainz für seine wertvollen Hinweise bei der Durchführung der Isotopenversuche.

Ausgeführt mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Literatur

AKABORI, SHIRO: Ber. dtsch. chem. Ges. **66**, 143 (1933). — ARNOLD, V.: Z. Physiol. Chem. (Leipzig) **70**, 314 (1910/11). — ASTRUP, T., and A. BIRCH-ANDERSEN: Nature (Lond.) **160**, 570, 637 (1947).

BAUER, K. H.: Die organische Analyse, 2. Aufl. 1950. — BELOSERSKI, A. N., u. N. J. PROSKURJAKOW: Praktikum der Biochemie der Pflanzen; 1. Aufl. (S. 336; Bernsteinreagens). Berlin: Akademie Verlag 1956. — BINKLEY, F.: J. of Biol. Chem. **150**, 261 (1943). — BOST, R. W.: J. Amer. Chem. Soc. **54**, 1985 (1933). — Chem. Zbl. I. S. 253 (1934). — BOYER, P. D.: J. Amer. Chem. Soc. **76**, 4331 (1954).

CHARGAFF, E., u. Mitarb.: J. of Biol. Chem. **175**, 67 (1948). — CRAMER, F.: Papierchromatographie; 2. Aufl. Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie 1954.

FISCHER, R. B.: Z. anal. Chem. **25**, Nr. 10 (1953). — FORSSBERG, J.: Acta Radiol. (Stockh.) Suppl. **49**; 1 (1943). — FRIEDEMANN, T. E., and G. E. HAUGEN: J. of Biol. Chem. **147**, 415 (1943).

GROTE, J.: J. of Biol. Chem. **93**, 301 (1931). — GRÜNE, H.: Sonderdruck, Einführung in die Papierchromatographie 1953.

HILLER, A.: J. of Biol. Chem. **53**, 253 (1922). — HOLLAENDER, A.: Radiation Biol. II. New York, Toronto, London: McGraw-Hill 1954.

JANKE, A.: Biochem. Z. **278**, 30 (1935).

KAMENOSUKE SHINOHARA: Chem. Zbl. II (1935). — KASSEL, B.: J. of Biol. Chem. **125**, 115, 145 (1938). — KOFRANYI, E., u. Mitarb.: Ztschr. Physiol. Chem. (Leipzig) **299**, 129 (1955); **287**, 170 (1951). — KÜHNAU, J.: Biochem. Z. **230**, 352 (1931).

LEHNARTZ, E., u. B. FLASCHENTRÄGER: Physiologische Chemie, 1. Aufl. Göttingen: Springer 1951.

MARKEES, G.: Experientia (Basel) **11**, 205 (1955). — MEYER, R.: Biochem. Z. **198**, 463 (1928). — Arch. Mikrobiol. **1**, 277 (1930).

NEISH, A. C.: Anal. Meth. for Bact. Fermentstadios Saskatoon. 1952. — NEUBERG, C., u. M. KOBEL: Biochem. Z. **185**, 477 (1927).

OLCOTT, H. S.: Chem. Rev. **41**, 151 (1947).

PAECH, K., u. M. V. TRACEY: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, II. Berlin: Springer 1955. — PAULI, W.: Kolloidchemie der Eiweißkörper. 1. Aufl. Berlin: Springer 1926. — PETERS, J., u. A. RIPPET-BALDES: Arch. Mikrobiol. **14**, 203 (1950). — PFENNIG, N.: Arch. Mikrobiol. **25**, 109 (1956); **24**, 8 (1956). — POLSON, A., u. Mitarb.: Science (Lancaster Pa.) **105**, 603 (1947).

RAVEUX, R.: C. r. Acad. Sci. (Paris) **231**, 729, 1006, 1107, 1254 (1950); **238**, 1150 (1954). — REID, Q. L.: Biochemic. J. **50**, 421 (1951). — RIPPET, A., u. G. BEHR: Arch. Mikrobiol. **7**, 584 (1936). — RIPPET-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiol. 3. Aufl. Göttingen: Springer 1955. — RIPPET-BALDES, A., G. BUSCH u. F. RADLER: Arch. Mikrobiol. **23**, 423 (1956). — RITTER, R.: Diss. Göttingen 1954. — ROBOTNOWA, J.: Mikrobiologija **18**, 509 (1949).

SCHMIDT-LORENZ, W.: Arch. Mikrobiol. **25**, 137 (1956/57). — SCHÖBERL, A.: Angew. Chem. **53**, 277 (1940). — SCHWIEGK, H.: Die künstlich radioaktiven Isotope in Medizin und Diagnostik. Berlin: Springer 1953. — SOLOWAY, S.: Nucleonics **10**, 52 (1952).

TAKAHATA, T.: Z. Physiol. Chem. (Leipzig) **136**, 82 (1924).

VOGEL, H., u. H. KNOBLOCH: Chemie u. Technik der Vitamine. Stuttgart: F. Enke 1955.

WINTERINGHAM, F. B. W.: Nucleonics **10**, 52 (1952). — WUNDERLY, CH.: Die Papierelektrophorese. Aarau: Sauerländer 1955. — WURZSCHMITT, F.: Fortschr. Chem. Forsch. **1**, 485 (1950.)

ZECHMEISTER, L., u. L. v. CHOLNOKY: Die chromatographische Adsorptionsmethode. Wien: Springer 1938.

(Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università di Perugia-Italia.
Kungl. Lantbrukshögskolans Mikrobiologiska Institution Uppsala-Sverige)

Torulaspora nilssoni nov. spec.

A new yeast from Swedish soils

By

AUGUSTO CAPRIOTTI

With 6 figures in the text

(Eingegangen am 15. Juni 1957)

In the microbiological analysis of 16 different samples of Swedish soils, made in September 1955, (utilizing a scholarship from the Swedish Ministry of Foreign Affairs), I was able to isolate 85 pure yeast cultures. They were studied for purposes of identification (CAPRIOTTI 1957 c). The results showed that these cultures must be attributed to 10 different species of yeast, 7 of which have been already described. These are: *Sacch. microellipsodes* var. *maltosa* Capriotti; *Hansenula californica* var. *ultuna* (Capriotti); *Torulopsis globosa* (Olson and Hammer); *Torulopsis ernobii* (Lodder and Kreger Van-Rij); *Candida parapsilosis* (Aschf.) Langeron and Talice; *Rhodotorula aurantiaca* (Saito) Lodder; *Rhodotorula rubra* (Demme) Lodder.

The strains which could not be identified with known species were attributed to 3 new species belonging to the genera *Torulaspora*, *Debaryomyces*, and *Candida*.

In this first paper I wish to give a complete and detailed description of the former species belonging to the genus *Torulaspora* that I propose to call *Torulaspora nilssoni* in honour of Professor RAGNAR NILSSON, Director of the Institute of Microbiology at Uppsala, Sweden.

Description

Origin of the strains. 26 strains were studied, all of them isolated from soils of Ultuna (Uppsala, Sweden), where potatoes, grain and lucern (*Medicago sativa*) were cultivated.

Method of study. The method applied to the study of the characters corresponds to that indicated by LODDER and KREGER VAN-RIJ (1952, 2) with one exception, however, as regards the procedure for the study of sugar assimilation. For these tests I considered it more appropriate to apply the method of cultures on cooked and washed agar, described in another paper (CAPRIOTTI 1955 a).

Growth in malt-extract: After three days at 25° C (Fig. 1, 2), cells were rounded, 2—6 micron, single, two by two and also in groups. Fermentation and rather lumpy sedimentation. After one month at 17° C, there was sedimentation and clear liquid.

Growth on malt agar: After three days at 25° C, cells were round, globular or slightly elliptical, $(2-6) \times (2.5-7)$ microns, single or two by two, budding.

Some few cells presented characteristic protuberances sometimes branched or with a small bulge at one end. Sometimes the protuberances are very long (Fig. 3). We can observe, too, some multilateral budding and "morula" like cells (Fig. 4).



Fig. 1. *Torulaspora nilssoni* nov. spec. ($\times 1000$)
(After 3 days in malt-extract)

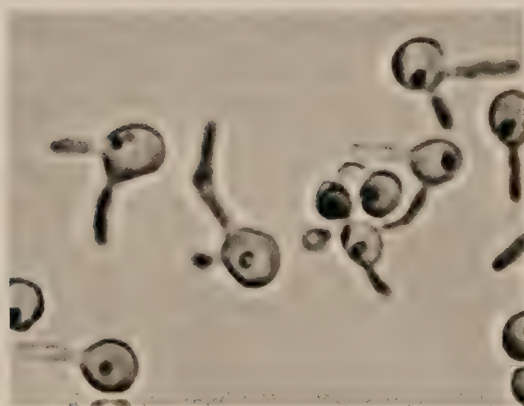


Fig. 2. *Torulaspora nilssoni* nov. spec. ($\times 1500$)
(After 3 days in malt-extract)

The streak culture after one month at 17° C, is whitish, flat, smooth, glistening. Margin smooth, not very abundant. In the course of time it tended to become yellowish-brown and the surface appeared covered with little warts, particularly in the lower part of the test tube.

Growth on carrot agar: After 3 days at 25° C, cells were round, globular or slightly elliptical, $(2-5.5) \times (2.5-6.5)$ microns, single, two by two and even three by three. In comparison with agar malt we noted a greater number of small cells.

The streak culture after one month at 17° C, is white, glistening, rather flat, waxy, rather developed. Surface not perfectly smooth. Margin smooth.

Growth on bean agar: After three days at 25° C, cells were roundish or slightly oval, $(2-6) \times (2.5-7)$ microns, single or two by two, budding.

We noted cells with an inchoate formation of protuberances. The streak culture after one month at 17° C,

is white-yellowish, glistening, rather developed, rather flat or slightly raised. The margin was smooth or slightly sinuous.

Growth on potato: After three days at 25° C, cells were round, globular, single or budding. Appearance and dimensions identical to that of malt agar. Presence of cells with characteristic protuberances that often end with one or two buds, sometimes with a more refractive content.

The streak culture after one month at 17° C, is white-yellowish, rather developed, smooth glistening. After one month it presents the same characters.

Growth on meat agar: Absent.

Culture on slide: No formation of pseudomycelium.

Growth on must gelatin: In the cultures of isolation there was a raised colony, white ish, non-fluidifying.

On the must-gelatin stab after 50 days at 18° C, there appeared a nail-shaped formation with raised head of a color ranging from dirty white to a yellow-brown with development along the infixed canal; brokenness and not liquefaction.

After one month at 18° C, the giant colony (Fig. 6) appeared round with a crateriform center the radius of which was one half of that of the whole colony. This crater was somewhat shallow. It was smooth and from it projected irregularly placed lobations.

Growth in milk: After 35 days at 25° C, there was no development.

Sporulation: Under normal microscopic observation on malt-agar, Gorodkova-agar and gypsum blocks, begun after 48 hours and continued for more than three months, no cases of conjugation were observed, but only parthenogenetic production of asci containing 1 or 2 and, more rarely, even 3 or 4 spores (Fig. 5).

Yet, on must-gelatin we have observed sometimes cells in conjugation.

Fermentation: glucose +; galactose +; maltose —; saccharose +, raffinose + (total); inulin +; dextrin —.

Assimilation of sugars: glucose +; galactose +; maltose —; saccharose +; raffinose +; lactose —.

Assimilation of organic salts (pH 4,8): lactate +; pyruvate + (weak); tartrate —; malate —; oxalate —; citrate —; succinate —.

Assimilation of nitrogen sources: potassium nitrate; — ammonia sulphate +; asparagine +.

Development in presence of ethyl alcohol as sole source of carbon: Rather scarce.

Splitting of arbutin: Absent.

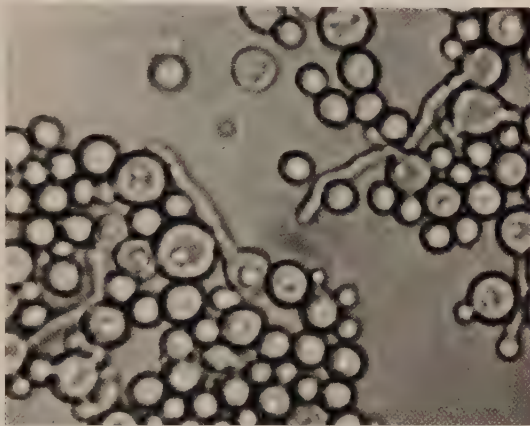


Fig. 3. *Torulaspora nilssoni* nov. spec. ($\times 1500$)
(Long protuberances on malt-agar after 4 weeks)

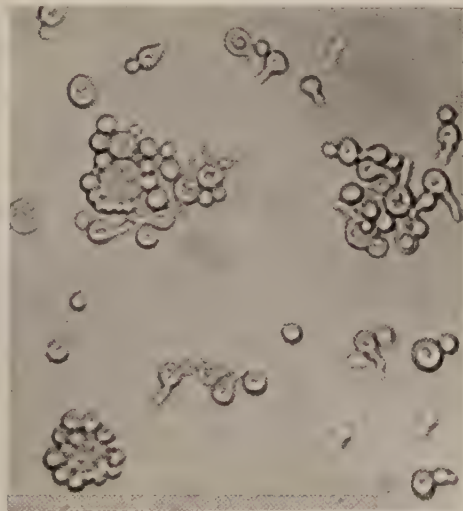


Fig. 4. *Torulaspora nilssoni* nov. spec. ($\times 800$)
(After 15 days in malt-extract)

Fermentative power: In normal grape must, at a pH of 3,5, the amounts of alcohol produced ranged from a minimum of 7,5 to a maximum of 10,10, expressed as a percentage of volume.

Discussion

I must state, first of all, that it is not my intention to undertake the revision of the genus *Torulaspora* recently combined with the genus *Saccharomyces* by LODDER and KREGER VAN-RIJ.

I will, however, return as soon as possible to this question, using also the recent technique established by WICKERHAM and BURTON (1956) with a comparative study of the species already known and of those which I have recently isolated belonging to the genus *Torulaspora*, with the more representative species of the genera *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces*. I shall limit myself for the time being to relate only the latest development of our knowledge of *Torulaspora* and of the species ascribed to it. I shall then mention the reasons



Fig. 5. *Torulaspora nilssoni* nov. spec.
(Giant colonies on malt-gelatin after 4 weeks)

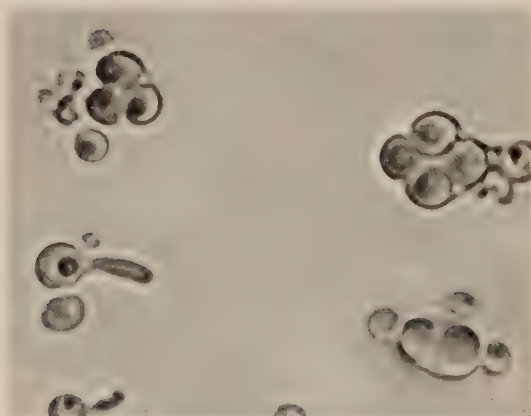


Fig. 6. *Torulaspora nilssoni* nov. spec. ($\times 1500$)
(Spores on malt-agar after one month)

why I cannot agree with the two authors when they question the validity of the genus *Torulaspora*.

This genus was created in 1904 by LINDNER and later was recognized valid by GUILLIERMOND (1912/1928) and by STELLING-DEKKER (1931). The characters of this genus are the following: cells are round, spherical, small; each one has a large oil drop in the middle. They resemble the

typical *Torula*. The asci arise after an incomplete attempt to conjugate through one or more tubules. The ascospores are round with an oil drop in the middle. The walls are smooth and the number of ascospores varies from one to four per ascus.

KLOCKER (1909) had observed, however, that these characters are not sufficient to characterize a genus. Subsequently in 1932, KRUMBHOLZ (1931, 1933) after comparing *Torulaspora rosei* and *Zygosaccharomyces globiformis*, considered the genus *Torulaspora* no longer valid. He proposed for the other two species (to be ascribed to *Torulaspora*) the new combinations of *Zygosaccharomyces delbrueckii* (Lindner) Kr. and *Zygosaccharomyces fermentati* (Saito) Kr.

This thesis was also agreed upon by SACCHETTI (1934) who carried out parallel researches on the fermentation of inulin and of dextrin, using cultures of *Torulaspora rosei* and of *Zygosaccharomyces formis*.

In 1940 CASTELLI made a careful comparative study of 20 strains of *Torulaspora rosei* which he isolated from grape must and a strain of *Zygosaccharomyces globiformis* — typical form — received from the collection of Delft. While accepting the opinion that the two forms become occasionally synonymous, he did not agree with KRUMBHOLZ that the genus *Torulaspora* should be eliminated. According to CASTELLI, in the 20 strains he examined he was unable to observe any clear cases of conjugation and therefore he was of the opinion that the genus *Torulaspora* should be retained valid.

Recently the above cited LODDER and KREGER VAN-RIJ (1952) have concluded that there is no real difference between *Torulaspora* and *Zygosaccharomyces*, this accepting the opinion of KRUMBHOLZ who has affirmed that in *Zygosaccharomyces globiformis* isogamous and heterogamous conjugation can be observed, as well as transitional forms between the two. Moreover, on the basis of the research of WINGE (1935, 1937, 1939) and LINDEGREN (1944 a, 1944 b, 1945) and their co-workers (1943 a, 1943 b, 1944), who have demonstrated that *Zygosaccharomyces* is the haploid state of *Saccharomyces*, the Dutch authors decided to recognize only the validity of the genus *Saccharomyces*, thus ascribing all the species previously attributed to the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspora*.

Concerning the validity of the genus *Torulaspora*, I may say that for various reasons (and I shall return to this question later) I cannot agree with the opinion of the two authors. I too, like CASTELLI, and to a greater extent than he, have been able to examine a vast number of strains to ascribe *Torulaspora* and exactly 103 cultures originating from the widest possible sources: grape must (CAPRIOTTI 1952 a, 1952 b, 1953, 1956 a, 1956 b), cheese (CAPRIOTTI 1957 a) and soil (CAPRIOTTI 1955 a, 1955 b, 1957 b). As a result, careful microscopic observations of cultures (on malt-agar; Gorodkowa-agar and gypsum blocks) of the most diverse ages

have never shown the occurrence of clear cases of conjugation, even if in some extremely rare cases I was able to note cells united by its two apiculi. On the other hand, in the numerous strains to ascribe to various species of *Zygosaccharomyces*, cultivated under the same conditions, cases of conjugation were invariably observed.

However, attempts to conjugation by the emission of characteristic tubules, constituted a character that, I believe, justifies the retaining of *Torulaspora* distinct from *Saccharomyces*.

On the other hand, it is very important to remember that every classification has to be considered as something artificial. However, it is an indispensable point of reference for researchers in order that they may understand one another and speak the same language. A classification should facilitate the task of identification for whoever dedicates himself to it, and should not impede him by bringing up continual uncertainties.

Thus, the genus *Saccharomyces*, as LODDER and KREGER VAN-RIJ understand it, has become excessively large in the same way as the genus *Candida* among the asporogenous yeasts.

Table 1

	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Torulaspora rosei</i>	<i>Torulaspora fermentati</i>	<i>Torulaspora nilssonii</i>
<i>Fermentation</i>				
glucose	+	+	+	+
galactose	+	—	—	+
maltose	—	—	+	—
saccharose	—	+	+	+
raffinose	—	+ (1/3)	+ (1/3)	+ (total)
inulin	—	+	+	+
dextrin	—	—	—	—
<i>Assimilation of the sugars</i>				
glucose	+	+	+	+
galactose	+	—	—	+
maltose	—	—	+	—
saccharose	—	+	+	+
raffinose	—	+	+	+
lactose	—	(weak)	(weak)	—

STELLING-DEKKER (1931) ascribes three species to the genus *Torulaspora*. These are: *Torulaspora delbrueckii* Lindner, *Torulaspora rosei* Guilliermond and *Torulaspora fermentati* Saito, which may be distinguished one from another in particular by the characters of the sugar fermentability. All three species have, in fact, cells that are round, or slightly oval. Their dimensions do not exceed 7—8 microns in length. They do not assimilate potassium nitrate, nor split arbutine. They show

negative or occasionally a weak development on ethyl alcohol as sole source of carbon.

The form we isolated from Swedish soils and that we have denominated *Torulaspora nilssoni* nov. spec. is identical to *Torulaspora rosei* and *Torulaspora fermentati* in the following characters: Morphology and cellular dimensions, characters of the films and of the liquid cultures; the capacity to ferment inulin, the inability to split arbutine and the characters relating to the assimilation of nitrogenous substances.

The differences that justify the creation of a new species are clearly demonstrated in Table 1.

It is thus demonstrated that *Torulaspora nilssoni* nov. spec. differs from *Torulaspora delbrueckii* Lindner, in that it also ferments and assimilates saccharose and raffinose; from *Torulaspora rosei* Guilliermond, in that it ferments and assimilates galactose and entirely raffinose; and from *Torulaspora fermentati* Saito, in that it also ferments and assimilates galactose and entirely raffinose not maltose.

12 strains of *Torulaspora nilssoni* nov. spec. are preserved in the yeast collection of the Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica della Università di Perugia (Italy) and will be sent to anyone who requests them.

Latina diagnosis

Torulaspora nilssoni nova species

Maltato in musto cellulae rotundae (2—6) micron, singulae, binae aut acervatim inveniuntur. Sedimentum efficitur. — In maltato agar cellulae rotundae aut leniter ovoideae (2—6) \times (2,5—7) micron, singulae aut binae. Adsunt etiam cellulae cum tubere signato notatoque, quandoquidem bifurcato et parva saginatione summo in vertice. — Observantur etiam, at perraro, cellulae multis gemmis praeditis atque morulae facie. — Cultura (post unum mensem, 17° C) oculis subicitur albiflava, equa, glabra, aliquanto tenuis, non multo copiosa, margine levi. — Pseudomycelium deest. — Ascosporae glabrae, rotundae, 1—4 pro asco. — Glucosus, galactosus, saccharus, raffinosis totaliter fermentantur at inulina. — Minerali in medio cum glucosus, galactosus, saccharus et raffinosis, multiplicatur atque augetur. — Nitralkalicus non assimilatur. — Minerali in medio cum alcohole aethilico parumper crescit. — Arbutinum non finditur.

Summary

A new species of *Torulaspora* is described; it was isolated from some Swedish soils. This species is named *Torulaspora nilssoni* nov. spec. [in honour of Prof. RAGNAR NILSSON (director of Institute of Microbiology, Royal Agriculture College of Sweden, Uppsala 7) and his assistant Dr. PER ERIC NILSSON].

References

CAPRIOTTI, A.: Riv. viticol. **6**, 7, 8 (1952a); Ann. Facoltà Agraria di Perugia (Italia) **8**, 64 (1952b); Atti Accad. Italiana Vite e Vino (Siena) **5**, 262 (1953) Biochimica applicata, II, **1**, 31 (1955a); Ann. Facoltà di Agraria di Perugia (Italia), **10**, 162 (1955b); Riv. di Biologia (Perugia-Italia) XLVII, 2, 209 (1955c); Atti dell'Ac-

cad. Italiana Vite e Vino (Siena) **8**, 38 (1956a); Gli agenti della fermentazione vinaria della Sardegna. In print (1956b); I lieviti del formaggio Limburgo. In print (1957a); Las levaduras de algunos terrenos Espanoles. In print. (1957b); The yeasts in some Swedish soils. In print. (1957c). — CASTELLI, T.: Arch. Mikrobiol. **11**, 119 (1940). — GUILLIERMOND, A.: Les Levures. Octave Doin et fils-Editeur, Paris-327 (1912); Clef dichotomique pour la determination des levures, Paris (1928). — KLÜCKER, A.: To see GUILLIERMOND (1912) and Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg **7**, 273 and **8**, 4 (1909). — KRUMBHOLZ, G.: Arch. Mikrobiol. **2**, 411 (1931); **4**, 167 (1933). — LINDEGREN, C. C.: Walleste. Lab. Communicat. **7**, 153 (1944a); Bot. Gaz. **105**, 304 (1944b); Bact. Rev. **9**, 111 (1945). — LINDEGREN, C. C., and G. LINDEGREN: Proc. Nat. Acad. Sci. **29**, 306 (1943a); Ann. Missouri Bot. Garden **30**, 453 (1943b); **31**, 303 (1944). — LINDNER, P.: Jahrb. Versuchs- u. Lehranstalt. Brau., Berlino, **7**, 444 (1904). — LODDER, J., and N. J. W. KREGER VAN RIJ: The Yeasts. North Holland Publishing Company-Amsterdam (1952). — SACCHETTI, M.: Industr. saccar. ital. **27**, 49 (1934). — STELLING-DEKKER, N. M.: Die sporogenen Hefen. Verhandel. Koninkl. Akad. Wetenschap. Aft. Natuurkunde, sec. II, **28**, 1, Amsterdam (1931). — WINGE, O.: C. r. Trav. Lab. Carlsberg **21**, 77 (1935). — WINGE, O., and O. LAUSTEN: C. r. Trav. Lab. Carlsberg **22**, 99 (1937); **22**, 337 (1939). — WICKERHAM, L. J., and K. A. BURTON: J. Bacter. **71**, 3, 290 (1956).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin)

Über die Substruktur von *Polystictus versicolor* L.*

Von

MANFRED GIRBARDT

Mit 16 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Juli 1957)

Im Rahmen der ausgedehnten cytologischen Untersuchungen an *Polystictus versicolor* war es notwendig, auch die Substruktur dieses Basidiomyceten kennenzulernen. Die Arbeiten wurden vor allem durchgeführt, um verschiedene Fragen der Kernteilung einer Klärung näherzubringen. Die Ausbeute an Teilungsstadien ist jedoch noch so mager, daß die Ergebnisse erst zu einem späteren Zeitpunkt veröffentlicht werden können.

Im gegenwärtigen Stadium der Substrukturforschung scheint es notwendig, möglichst viele Objekte vergleichend betrachten zu können. Da bisher nur wenige elektronenmikroskopische Befunde an Pilzen vorliegen (TSUDA 1955 u. 1956, YAMAMOTO u. KITAMURA 1953, KELLING u. SCHLEICH 1954, TURIAN u. KELLENBERGER 1956), sollen die für den Ruhekern und andere Zellstrukturen von *Polystictus versicolor* erhaltenen Ergebnisse mitgeteilt werden.

Material und Methode

Der in früheren Arbeiten verwendete Stamm von *Polystictus versicolor* (GIRBARDT 1955a) wurde in Petrischalen auf Malzagar, der mit einer dünnen Schicht von Malzwasser übergossen war, gezüchtet. In dieser Malzwasserschicht breiten sich die wachsenden Hyphen in radialer Richtung aus und können leicht abgenommen werden.

Mit der Pinzette werden kleine Hyphenzöpfe aus der Spitzenregion abgerissen und sofort in die Fixierungsflüssigkeit gebracht. Die Fixierung erfolgt nach PALADE (1952) bei pH 7,1—7,4. Der gepufferten OsO_4 -Lösung war Saccharose (0,1 mol) zugesetzt. Die Fixierungsdauer betrug 30 min, die Nachfixierung und Härtung in Formol (3,6%) 6 Std. Nach Alkoholentwässerung wurden die Objekte in Metacrylat eingebettet (NEWMAN u. Mitarb. 1949). Dabei wurde eine Mischung von 10 Teilen Metacrylsäurebutylester mit 7 Teilen Metacrylsäuremethylester unter Zusatz von 1% Benzoin angewendet. Die Polymerisation erfolgte im UV-Licht (10 Std). Es empfiehlt sich, die Objekte erst 2—3 Wochen nach der Einbettung zu schneiden.

Die Dünnschnitte wurden mit dem Ultramikrotom nach NIKLOWITZ (1955) angefertigt und entweder mit dem elektrostatischen Elektronenmikroskop (VEB Carl Zeiss/Jena) bei 48 kV oder dem elektromagnetischen Gerät (Werk für Fernmeldewesen „WF“/Berlin-Oberschöneweide) bei 62 kV untersucht¹.

* Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. O. RENNER, zum 75. Geburtstag in tiefer Verehrung gewidmet.

¹ Ich danke Frl. E. FRITSCHÉ für ihre Hilfe bei den Präparationsarbeiten.



1. Cytoplasma

Im phasenoptischen Lebendbild (GIBBARDT 1955 a) zeigt *Polystictus versicolor*, wie die Mehrzahl der bisher untersuchten Basidiomyceten, eine ausgeprägte Zellpolarität. Diese äußert sich darin, daß das Cytoplasma des apikalen, wachstumsfähigen Pols einen höheren Brechungsindex als das des basalen Pols besitzt. Parallel dazu geht die Basophilie und möglicherweise auch die Stoffwechselaktivität des Cytoplasmas.

Die Polaritätserscheinung tritt nicht nur in der Spitzenzelle auf, sondern wiederholt sich in jeder einzelnen Zelle der Hyphe. Dabei nimmt jedoch die Menge des „dichten“ Cytoplasmas in den älteren Zellen ab. Rechnet man von der Spitze aus rückwärts, so besitzt etwa die 4. bis 5. Zelle praktisch nur noch phasenoptisch „leeres“ Cytoplasma, d. h. solches mit sehr geringem Gehalt an Trockensubstanz (BARER u. JOSEPH 1954).

Auch das elektronenmikroskopische Bild zeigt die unterschiedlichen Cytoplasmen. Sind im Schnitt ältere Zellen des Mycels getroffen, so erscheint das Cytoplasma stark aufgelockert und ohne besondere Strukturen. In den Hyphenregionen, die den phasenoptisch „dichten“ Zellbereichen entsprechen, ist es dagegen auch in seiner Substruktur sehr dicht und oft so stark elektronenstreuend, daß Einzelheiten kaum zu erkennen sind. Dies steht in Übereinstimmung mit den

Abb. 1. *Polystictus versicolor*, tangentialer Längsschnitt durch die Schnallenregion einer vegetativen Hyphe. HH Haupthyphie, NH Nebenhyphie, S Schnalle, FH Fusionshöcker, Qu Querwand, ZK Zellkern, FO fädige Organellen. Originalvergrößerung 8700 : 1, nachvergrößert auf 16 000 : 1

Ergebnissen von STRUGGER (1957), der das Cytoplasma wachsender Meristemzellen von *Allium cepa* deutlich unterschieden findet von jenem älterer, differenzierter Zellen.

Besonders deutlich wird der Unterschied bei *Polystictus versicolor* an Querwänden, da hier apikaler Pol der subterminalen und basaler Pol der terminalen Zelle aneinandergrenzen.

Abb. 1 zeigt einen tangentialen Längsschnitt durch die Schnallenregion einer Spitzenzelle und vermittelt einen Eindruck von den Unterschieden der Cytoplasmen im submikroskopischen Bereich.

Die Wachstumsrichtung der Hyphe verläuft in Abb. 1 von unten nach oben. Die eigentliche Schnalle (S) der Haupthyphe (HH) ist im Schnitt nicht getroffen, während der Fusionshöcker (FH) (GIRBARDT 1956) gut sichtbar ist.

Die Nebenhyphe (NH) ist normal hinter der Haupthyphenquerwand (QW) ausgewachsen. Da gerade ein Zellkern (ZK) in die Nebenhyphe einwandert, ist die Entwicklungsphase eindeutig charakterisiert: Die Nebenhyphe war im Augenblick der Fixierung in vollem Wachstum begriffen und der Kern hätte sich 10—15 min später geteilt.

Oberhalb der Querwand liegt der basale Pol der Spitzenzelle mit dem „ruhenden“ Cytoplasma, dessen stark aufgelockerte Struktur deutlich wird. Die auch im phasenoptischen Lebendbild gut erkennbaren fädigen Organellen („Chondriosomen“ Abb. 1, FO) treten klar umrissen hervor.

Unterhalb der Querwand liegt das stärker elektronenstreuende Cytoplasma des apikalen Pols der Subterminalen. In der ausgewachsenen Nebenhyphe (NH) nimmt seine Dichte in Richtung der wachsenden Spitze zu.

Vereinzelt zeigt das „dichte“ Cytoplasma bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 2) eine gut sichtbare Strukturierung in Form kontrastreicher Linien. Diese laufen häufig parallel nebeneinander (in Abb. 2 durch Pfeile markiert). Die Dicke der kontrastreichen Linien liegt im Mittel bei 80 Å, während der kontrastarme Zwischenraum etwa 130 Å dick ist.

Oft bilden die kontrastreichen Linien auch kreisförmige oder elliptische Ringe. Der Durchmesser dieser Ringe schwankt in weiten Grenzen.

Es war bisher nicht möglich, den Bildern eine eindeutige Struktur des Cytoplasmas zuzuordnen. Die Vermutung liegt nahe, daß fibrillare oder tubulare Elemente vorhanden sind. Einige Bilder deuten jedoch darauf hin, daß auch ein lamellarer Aufbau in Betracht gezogen werden muß.

Die äußere Plasmasschicht, der nach den vielgestaltigen zellphysiologischen Untersuchungen eine wesentliche Funktion bei der Stoffaufnahme zugeschrieben werden muß, hat sich bisher einer eindeutigen Analyse ihrer Struktur entzogen. Bei tierischen Geweben stellt sie sich als Doppellamelle dar (SJÖSTRAND u. HANZON 1954), während sie bei Bakterien granuläre Struktur besitzt (HOUWINK 1953 u. 1956, SALTON u. WILLIAMS 1954).

Bei *Polystictus versicolor* erscheint das der Zellwand unmittelbar anliegende Cytoplasma als kontrastreiche, scharf abgesetzte Grenzschicht (Abb. 3 PM). Man erhält so den Eindruck, als liege eine „Plasmamembran“ vor.

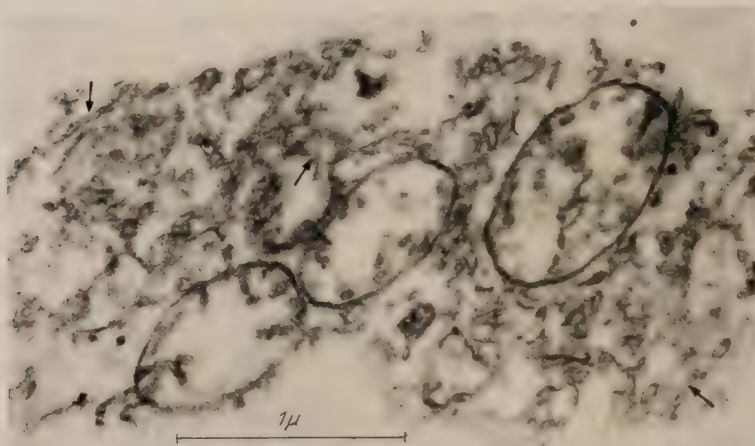


Abb. 2. *Polystictus versicolor*, Längsschnitt durch vegetative Hyphe. Feinstruktur des Cytoplasmas. 3 strukturierte Granula sind angeschnitten. Originalvergrößerung 8700:1, nachvergrößert auf 30 000:1

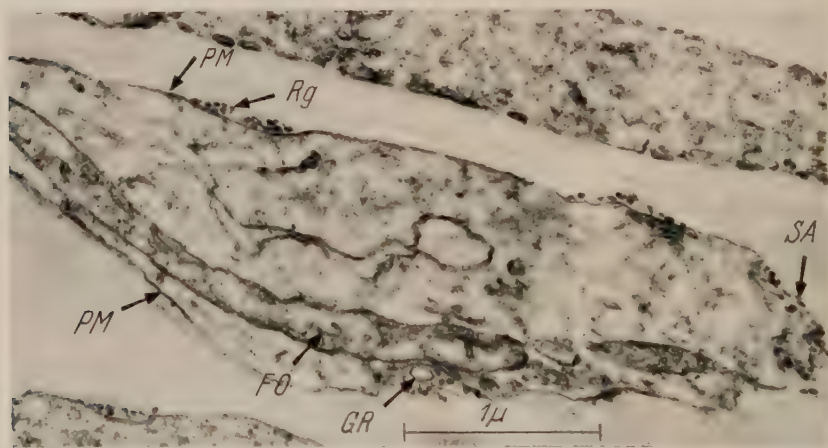


Abb. 3. *Polystictus versicolor*, schräg geführter tangentialer Längsschnitt. PM „Plasmamembran“, Rg Ringe in der cytoplasmatischen Grenzschicht, GR große Ringe, SA schräger Anschnitt, FO fädige Organellen. Originalvergrößerung 11 000:1, nachvergrößert auf 25 000:1

Auffallend sind die anscheinend außerhalb der „Plasmamembran“ liegenden, verschieden geformten „Ringe“ (Rg). Sie sind sowohl in Längs- (Abb. 3) wie in Querschnitten (Abb. 4, Rg) in gleicher Form vorhanden. Ihr innerer Durchmesser schwankt zwischen 80 und 800 Å. Die großen

Ringe (GR) treten in jüngeren Zellen nur vereinzelt auf, während sie in älteren Hyphenteilen vorherrschen.

Es fällt nicht leicht, sich eine Vorstellung davon zu machen, wie dieses Erscheinungsbild zustande kommt. Da die „Plasmamembran“ stets an den Stellen, an denen die „Ringe“ sichtbar werden, nach dem Inneren der Zelle eingebogen ist, könnten die „Ringe“ hohlkugelähnliche Strukturelemente darstellen. Diese Kugeln müßten dann zwischen „Plasma-

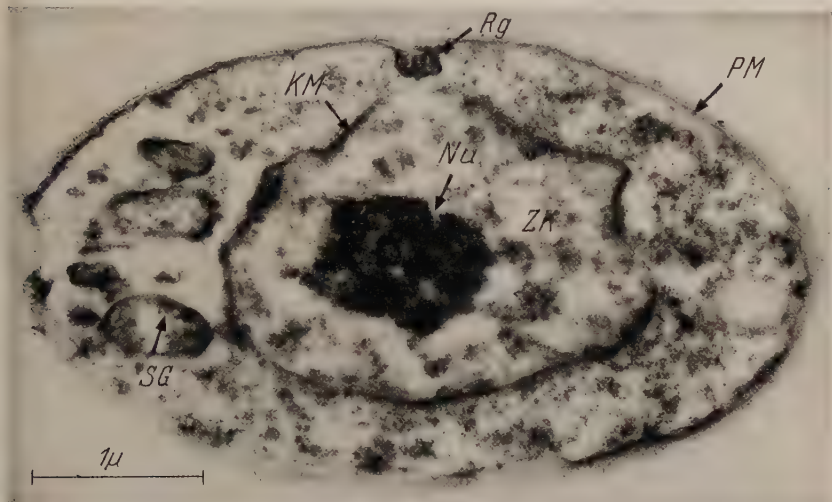


Abb. 4. *Polystictus versicolor*, vegetative Hyphe quer. PM Plasmamembran, Rg Ringe in der cytoplasmatischen Grenzschicht, SG strukturierte Granula, ZK Zellkern, KM Kernmembran, Nu Nucleolus. Originalvergrößerung 11 000:1, nachvergrößert auf 22 000:1

membran“ und Zellwand liegen und irgendwelche vom Cytoplasma abgegliederte Einheiten sein.

Wahrscheinlicher dürfte die Deutung sein, daß die „Ring“-Areale Flächenansichten der „Plasmamembran“ sind. Diese Flächenansichten könnten so entstehen, daß bei der Präparation die „Plasmamembran“ nach innen umbiegt und daher stellenweise parallel der Oberfläche geschnitten wird. Diese Auffassung wird gestützt durch die Erscheinung, daß die „Ringe“ gehäuft an den schrägen Anschnitten (Abb. 3 SA) der Hyphe erscheinen. Sie würden danach nur scheinbar außerhalb der „Plasmamembran“ liegen, was zweifellos leichter vorstellbar ist.

Nach dieser Auffassung läge es zunächst nahe, die „Ringe“ als Plasmaporen anzusprechen. Ihre Größe verbietet es jedoch, sie als Teile eines Ultrafilters anzusehen. Die eigentliche semipermeable Schicht des Plasmalemmas dürfte nicht osmiophil sein und wird daher nicht dargestellt. Die aus osmiophilem Material bestehenden Ringe sind in diese Schicht eingelagert und erfüllen vielleicht Stützfunktionen, ähnlich wie es für

die „Poren“ der Kernmembran bei *Amoeba proteus* (BAIRATI u. LEHMANN 1952) und *Xenopus* (CALLAN u. TOMLIN 1950) angenommen wird.

Die mittlere Schnittdicke (etwa 200 Å) liegt über dem Durchmesser der kleinen Ringe und ihrem Abstand voneinander. In Längs- und Querschnitten muß daher die Vielzahl dieser „Ringe“ als geschlossene „Plasmamembran“ erscheinen. Lokale Verdichtungen auf der „Plasmamembran“ deuten jedoch das Vorhandensein der „Ringe“ an.

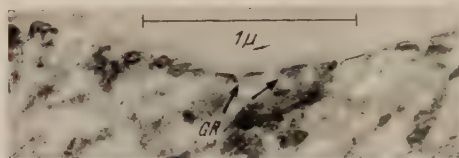


Abb. 5. *Polystictus versicolor*, ältere Hyphe längs. GR große Ringe längs geschnitten. Die „Plasmamembran“ ist regelmäßig unterbrochen. Originalvergrößerung 11 000:1, nachvergrößert auf 28 000:1

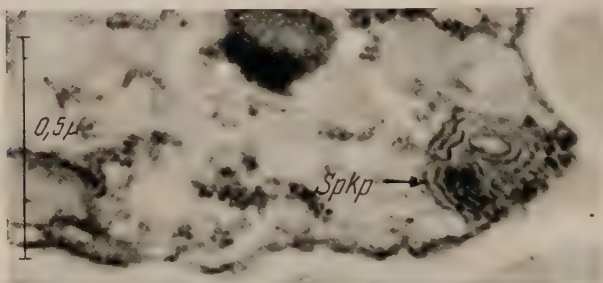


Abb. 6. *Polystictus versicolor*, Spitzenkörper (?) längs. Originalvergrößerung 11 000:1, nachvergrößert auf 58 000:1

Wie bereits erwähnt, nimmt in älteren Hyphenteilen die Anzahl der großen Ringe zu. Da deren Durchmesser über der mittleren Schnittdicke liegt, ist an Längs- und Querschnitten die „Plasmamembran“ regelmäßig unterbrochen (Abb. 3 GR u. Abb. 5 GR).

Vereinzelt treten Strukturen in Form konzentrischer Linien auf (Abb. 6). Diese Linien stehen mit den Ringen des Plasmalemmas in enger Verbindung. Sie erinnern in ihrer Anordnung an Liesegangsche Ringe. Nach Größenordnung und Lage könnten diese Strukturen dem Spitzenkörper (GIBBARDT 1957a) entsprechen.

2. Zellkern

Der Ruhekern ist, wie auch das Lebendbild zeigt, mehr oder weniger abgerundet (Abb. 4 u. 7). Die Wanderkerne sind langgestreckt (Abb. 8) und besitzen eine außerordentliche Formenlabilität. Besonders auffallend sind Stadien, in denen die äußere Begrenzung des Kernes deutlich gelappt erscheint (Abb. 9 KL).

Die Kernmembran stellt sich dar als beidseitig von einer kontrastreichen Linie begrenzte kontrastarme Schicht (Abb. 9 KM). Es dürfte sich dabei um eine Membran handeln, die OsO_4 an der inneren und äußeren Grenzfläche reduziert hat. Die kontrastreichen Linien sind etwa 50 \AA dick, ihr Abstand voneinander beträgt etwa 100 \AA . Die Membran umgibt als geschlossene Hülle den Kernsafttraum.

Der bei Mikroorganismen meist als Außenkern (AK) bezeichnete, vermutlich mit Karyolymphe erfüllte Raum zeigt sich im elektronenmikroskopischen Bild mehr oder weniger dicht granuliert. Besondere Strukturen oder eine besondere Ordnung der granulären Elemente sind nicht mit Sicherheit erkennbar. Gelegentlich auftretende lokale Verdichtungen dürften artifiziell entstanden sein. Die Karyolymphe bietet so das Bild eines koagulierten, ursprünglich homogenen Sols.

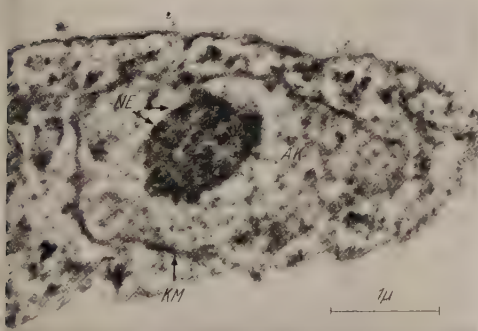


Abb. 7. *Polystictus versicolor*, Ruhekern längs. KM Kernmembran, AK Außenkern, NE sphäroide Einheiten, aus denen der Nucleolus aufgebaut ist. Originalvergrößerung 11 000:1, nachvergrößert auf 14 000:1

Abb. 8. *Polystictus versicolor*, Wanderkern längs. ZK 1 u. 2 die beiden Paarkerne, NE sphäroide Einheiten des Nucleolus, FO fädiges Organell. Originalvergrößerung 11 000:1, nachvergrößert auf 15 000:1



Abb. 8

Das im allgemeinen als Nucleolus (Abb. 4 Nu) angesprochene Gebilde besteht aus vielen kugeligen bis sphäroiden Einheiten (Abb. 7, 8 NE). Diese wiederum lassen zahlreiche, stark kontrastierte granuläre Bestandteile (Durchmesser etwa 100 Å) erkennen. Die größten, oft in Reihen angeordneten Einheiten besitzen einen Durchmesser von 100–200 m μ

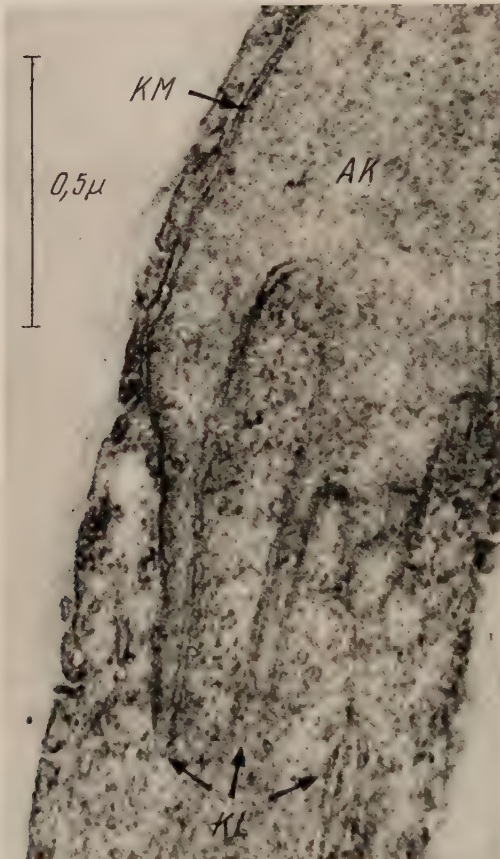


Abb. 9. *Polystyctus versicolor*, lappig ausgezogener Teil des Zellkerns. *KL* Lappige Ausläufer des Kernes, *KM* Kernmembran, *AK* Außenkern. Originalvergrößerung 8700:1, nachvergrößert auf 72 000:1.

und reichen damit an die Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops heran. Die regelmäßige Anordnung scheint auszuschließen, daß Strukturen vorliegen, die dem Nucleolonema ähneln (ESTABLE u. SOTELO 1950; BORYSKO u. BANG 1951; BERNHARD, et al. 1952 u. 1955).

Das Wesen dieser „Nucleolus“-Strukturen wird unserem Verständnis erst dann nahezubringen sein, wenn die Kernteilungsstadien eindeutig elektronenmikroskopisch erfaßt sind. Wie die Lebendanalyse immer deutlicher werden läßt, scheint der sogenannte Nucleolus entscheidenden Anteil am Teilungsgeschehen zu besitzen. Es wäre danach möglich, daß die sphäroiden Untereinheiten Nucleoproteidcharakter tragen. Hierüber wird später im Zusammenhang mit der Kernteilung ausführlich zu berichten sein.

3. „Chondriosomen“

Die lebende Zelle besitzt neben vielen granulaartigen Einschlüssen zahlreiche, phasenoptisch sehr gut sichtbare, fädige Gebilde. Diese wurden vorläufig (GIRBARDT 1955a) rein morphologisch als „Chondriosomen“ angesprochen.

Gemessen an der Fülle von Granula in der lebenden Zelle erscheinen im Ultradünnschnitt außerordentlich wenig kugelige Gebilde. Die Ursache hierfür dürfte einmal in der Eigenschaft von *Polystictus versicolor* liegen, daß die Hauptmasse

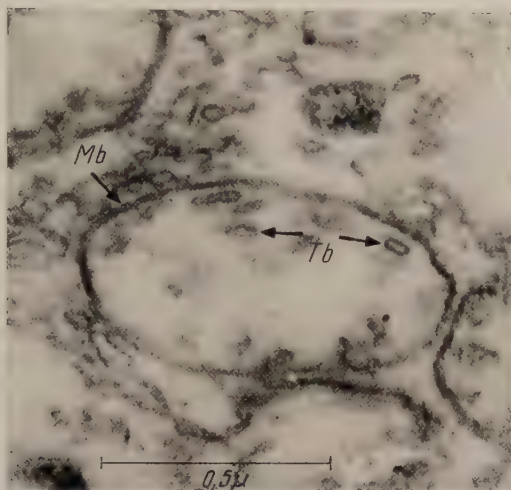


Abb. 10. *Polystictus versicolor*, strukturierte Granula. *Mb* Membran des Granulums, *Tb* elliptische Strukturen, die auf tubularen Feinbau hindeuten. Originalvergrößerung 8700:1, nachvergrößert auf 60 000:1

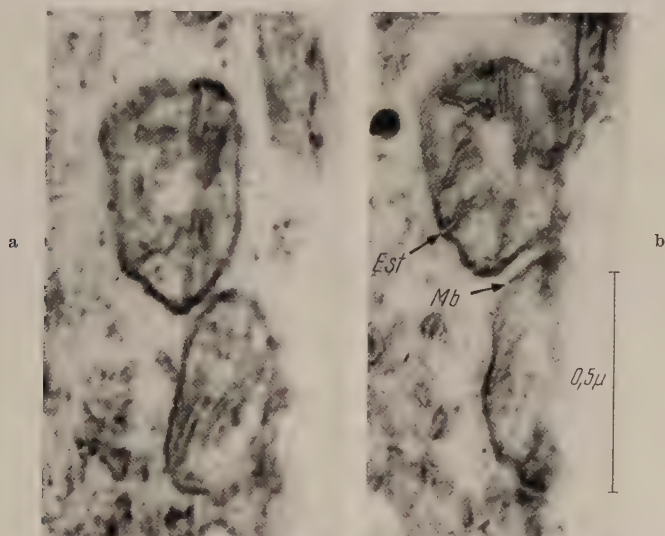


Abb. 11. *Polystictus versicolor*, strukturierte Granula. a und b sind Teilbilder einer Schnittserie. *Mb* Membran, *Est* Einstülpungsstelle der Tubuli. Originalvergrößerung 11 000:1, nachvergrößert auf 58 000:1

der Granula sich in der wachsenden Spitze befindet. Das Plasma dieser Region ist so stark elektronenstreuend, daß hier strukturierte Zellorganelle elektronenoptisch nicht identifiziert werden können. Zum anderen dürfte ein Teil der Granula Reserve-

stoffcharakter tragen. Es ist kaum zu erwarten, daß sich diese im Substrukturbild manifestieren.

Die strukturierten Granula (Abb. 10 u. 11) sind durch eine Membran (Mb) vom Cytoplasma abgegrenzt. Die kontrastreichen Schichten dieser Membran sind etwa 70 Å dick. Von der Peripherie zum Inneren laufen

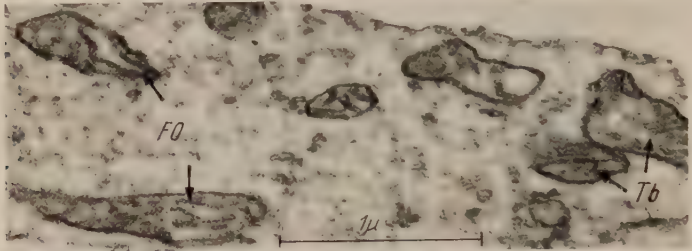


Abb. 12. *Polystictus versicolor*, fädige Organelle (FO) längs. Tubuli (Tb), als parallele, kontrastreiche Linien dargestellt. Originalvergrößerung 11000:1, nachvergrößert auf 26000:1

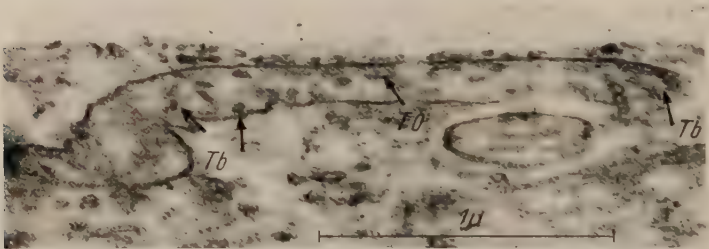


Abb. 13. *Polystictus versicolor*, fädige Organelle (FO) im Schrägschnitt; Tubuli (Tb) als elliptische Ringe und parallele Linien dargestellt. Originalvergrößerung 11000:1, nachvergrößert auf 38000:1

häufig in konzentrischer Richtung (Abb. 11 b), paarig angeordnete, kontrastreiche Linien (etwa 50 Å dick). Diese schließen eine kontrastarme Mittelschicht (etwa 100 Å dick) ein.

Da häufig kreisrunde oder elliptische Anschnitte im Innern zu beobachten sind (Abb. 10 Tb), scheint ein tubuläres System vorzuliegen, wie es WOHLFAHRTH-BOTTERMANN (1956 u. 1957) für die *Paramecium*-Mitochondrien beschrieben hat. Auch der Vergleich an Hand von Serienschnitten führt zu dieser Vorstellung (Abb. 11a u. b). Die erhaltenen Bilder deuten darauf hin, daß die Tubuli handschuhfingerähnliche Einstülpungen der inneren Membranschicht darstellen (Abb. 11 b Est).

Die fädigen Organellen (Abb. 12 u. 13 FO) der Zelle sind submikroskopisch von einer stark osmiophilen Schicht umgeben. Im Gegensatz zu den Granula gelang es bisher nicht, die Membrannatur dieser Schicht nachzuweisen. Es besteht daher die Möglichkeit, daß die fädigen Gebilde vom Cytoplasma nur durch eine einfache Grenzfläche, vielleicht in Form eines Lipoidfilms, getrennt sind.

Das Lebendverhalten der fädigen Gebilde kann besonders gut an Hand von Mikrofilmen (GIRBARDT 1957 b) untersucht werden. Hier zeigt sich, daß sie im Verlaufe weniger Sekunden ein Vielfaches ihrer ursprünglichen Länge erreichen oder in perlschnurähnliche Ketten zerfallen können. Dies ist mit der Vorstellung, daß sie vom Cytoplasma nur durch eine Grenzfläche geschieden sind, gut in Einklang zu bringen. Auf die Problematik der mit den fädigen Gebilden zusammenhängenden Fragen soll an anderer Stelle eingegangen werden.

Die Strukturen im Innern der fädigen Gebilde ähneln weitgehend den für die Granula beschriebenen. Auch hier scheinen tubulare Elemente (Tb) vorzuliegen, die in Abb. 12 hauptsächlich längs, in Abb. 13 dagegen bevorzugt quer geschnitten sind.

4. Zellwand

Die Chitinwand von *Polystictus versicolor* besitzt kein osmiophiles Material und ist auf Ultradünnschnitten im Elektronenmikroskop nicht darstellbar. Es ist daher überraschend, daß die dem Plasmalemma unmittelbar anliegende Schicht der Zellwand als zarte Linie (Abb. 14 Zw)

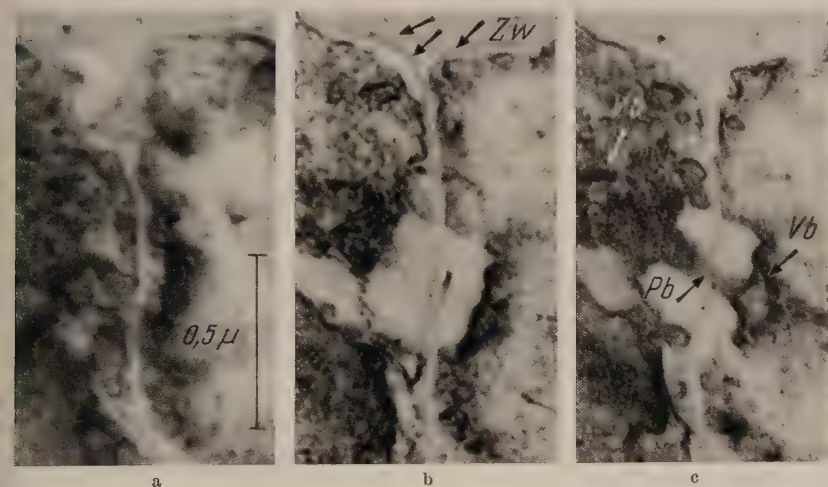


Abb. 14. *Polystictus versicolor*, Einzelbilder einer Längsschnittserie durch die Querwand der Haupthyphe a—c von der Peripherie zum Zentrum fortschreitend. *Zw* innerste Schicht der Zellwand, *Pb* Cytoplasmabrücke, die die Nachbarzellen miteinander verbindet, *Vb* bandförmiges Gebilde, das vielleicht bei Zellerstörung den Querwandporenschließen kann.

Originalvergrößerung 11 000:1, nachvergrößert auf 45 000:1

erscheint, die etwa 80 Å dick ist. Dies deutet darauf hin, daß die innere Wandschicht von cytoplasmatischen Elementen durchsetzt ist, die eine Osmiumablagerung ermöglichen.

Eine Messung der eigentlichen Wandstärke wird an Querwänden möglich. Hier erscheinen zwei zarte Linien, die den Plasmalemmen der Nachbarzellen unmittelbar anliegen (Abb. 14 b). Das Querwandmaterial

ist vermutlich zwischen den beiden zarten Linien abgelagert. Als Wanddicke ergibt sich 200 Å.

Es ist lehrreich, das phasenoptische Lebendbild (Abb. 15) mit diesem Befund zu vergleichen. Die weit unter der lichtoptischen Auflösungsgrenze liegende Zellwand ist phasenoptisch deutlich zu erkennen. Es wäre jedoch verfehlt, hier eine Dickenmessung zu versuchen, da diese zu völlig irrealen Werten führen würde. Dies mahnt einmal mehr, bei der Deutung phasenoptischer Bilder größte Vorsicht walten zu lassen.

5. Querwandporen

Bei den meisten Phycomyceten und Ascomyceten ist eine Perforation der Querwände unbestritten. Die „septal pores“ sind so groß, daß Granula und kleine Kerne, die vom Plasmastrom mitgeführt werden, hindurchrutschen können. Bei *Polystictus versicolor* sind Poren in lichtmikroskopischen Dimensionen nicht vorhanden. Aus den Zelloperationen (GIBBARDT 1955b) wurde gefolgert, daß vielleicht winzige Poren vorhanden sind, „die augenblicklich verschlossen werden können“.

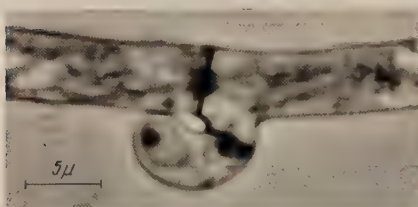


Abb. 15. *Polystictus versicolor*, Phasenkontrast lebend. Die Querwände stehen kurz vor der Fertigstellung. Vergrößerung 2000:1

Diese Vorstellung ließ sich submikroskopisch bestätigen. Abb. 14 soll an Hand von Einzelbildern einer Schnittserie einen Eindruck von den Verhältnissen an der

Querwand vermitteln. Abb. 14a zeigt einen Längsschnitt durch die periphere Region der Hyphe. Die Cytoplasmen der benachbarten Zellen sind völlig getrennt. Plasmodesmen konnten nicht gefunden werden.

Der auf Abb. 14b wiedergegebene Schnitt hat die Hyphe mehr median getroffen. Die Cytoplasmen sind etwa in der Mitte der Querwand auffällig abgehoben. Es läßt sich nicht entscheiden, ob diese Abhebung vital präformiert ist (dann müßte der elektronenoptisch kontrastlose Raum mit Substanz erfüllt sein), oder ein Fixierungsartefakt darstellt. Die kalottenähnlichen Räume treten mit großer Regelmäßigkeit auf (vgl. Abb. 16a u. b).

Abb. 14c läßt erkennen, daß eine dünne Cytoplasmabrücke (Pb) von etwa 600 Å Dicke die Nachbarzellen miteinander verbindet. Die Analyse zahlreicher Bilder läßt es wahrscheinlich werden, daß die Wand an der Stelle der Plasmabrücke ein Loch vom Durchmesser der plasmatischen Verbindung besitzt.

Es kann vorläufig nicht entschieden werden, ob mehrere cytoplasmatische Stränge durch eine Querwand hindurchlaufen oder ob nur ein zentraler, submikroskopischer Porus vorhanden ist.

In Schnitten, die den plasmatischen Verbindungsstrang zweier Nachbarzellen getroffen haben, erscheint regelmäßig je ein halbkreis-

förmiges Gebilde (Abb. 14c, 16a u. b: Vb) im Cytoplasma beider Zellen. In ihm alternieren kontrastreichere mit kontrastärmeren Abschnitten (Abb. 16a u. b).

Aus der Schnittserie (Abb. 14) geht hervor, daß es sich um ein band- oder stabförmiges Gebilde handeln muß, dessen Breite etwa dem Durchmesser des plasmatischen Verbindungsstranges entspricht.

Möglicherweise erfüllen diese Gebilde die aus früheren Versuchen geforderte Verschlufsfunktion. Bei der Zerstörung einer Zelle tritt an der Querwand ein starker Druckunterschied zwischen der turgeszenzlosen,

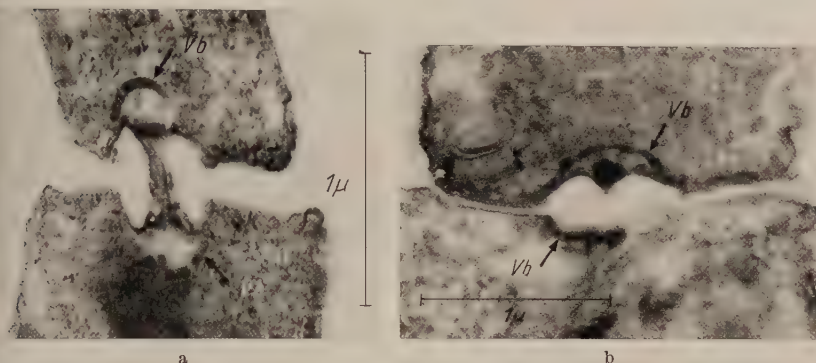


Abb. 16. *Polystictus versicolor*, Querwand der Haupthyphae (a) und Schnalle (b) längs. Vb Verschlufband zu beiden Seiten des Querwandporus. Originalvergrößerung 11 000:1, nachvergrößert auf 35 000:1

zerstörten und der turgeszenten, unbeschädigten Zelle auf. Der in der ungestörten Zelle herrschende Druck könnte dazu führen, daß das bandförmige Gebilde an die Querwand gepreßt wird und den Porus verschließt.

Zusammenfassung

An Hand von Ultradünnschnitten wird die Substruktur von *Polystictus versicolor* untersucht.

Wachsendes, stoffwechselaktives Cytoplasma ist elektronenoptisch deutlich vom ruhenden Cytoplasma unterschieden.

Das wachsende Cytoplasma scheint tubularen bzw. lamellaren Feinbau zu besitzen.

Im Plasmalemma lassen sich ringförmige Gebilde verschiedener Größe darstellen, die vermutlich Stützfunktion erfüllen.

Der Zellkern besitzt eine Kernmembran. Im Außenkern sind keine besonderen Strukturen erkennbar. Der Nucleolus besteht aus kugeligen bis sphäroiden Einheiten.

Die strukturierten Granula sind von einer Membran umgeben und besitzen Tubuli. Ähnliche Innenstruktur zeigen die fädigen Zellorganellen. Bei ihnen ließ sich jedoch bisher keine Außenmembran nachweisen.

Die Querwände scheinen Poren von submikroskopischen Dimensionen zu besitzen. Die Cytoplasmen benachbarter Zellen stehen nur durch diese Poren miteinander in Verbindung.

Beiderseits der cytoplasmatischen Verbindungsbrücke zwischen zwei Zellen liegt ein bandförmiges Gebilde, das möglicherweise die Querwandporen verschließen kann.

Literatur

BAIRATI, A., u. F. E. LEHMANN: Über die submikroskopische Struktur der Kernmembran bei *Amoeba proteus*. *Experientia* (Basel) **8**, 60 (1952). — BARER, R., and S. JOSEPH: Refractometry of living cells. *Quart. J. Microsc. Sci.* **95**, 399–423 (1954). — BERNHARD, W., F. HAGUENAU et CH. OBERLING: L'ultra-structure du nucléole de quelques cellules animales, révélée par le microscope électronique. *Experientia* (Basel) **8**, 58–59 (1952). — BERNHARD, W., A. BAUER, A. GROPP, F. HAGUENAU et CH. OBERLING: L'ultra-structure du nucléole de cellules normales et cancéreuses. *Exper. Cell. Res.* **9**, 88–100 (1955). — BORYSKO, E., and F. B. BANG: Structure of the nucleolus as revealed by the electron microscope. IX. Congr. of the EMSA 1951.

CALLAN, H. G., and S. G. TOMLIN: Investigation of the structure of the nuclear membrane by means of the electron microscope. *Proc. Roy. Soc. (London)* **137**, 367 (1950).

ESTABLE, C., and J. R. SOTELO: A new cellular structure: The nucleoloneme. *Inst. Ciencias Biol. Montevideo* **1**, 105 (1950).

GIBBARDT, M.: Lebendbeobachtungen an *Polystictus versicolor*. *Flora* (Jena) **142**, 540–563 (1955a) — Untersuchungen über die Querwandbildung bei Basidiomyceten. *Ber. dtsch. bot. Ges.* **68**, 423–434 (1955b). — Schnallenanomalien bei *Polystictus versicolor* (L.). *Arch. Mikrobiol.* **23**, 413–422 (1956). — Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor* (L.). *Planta* (Berl.) **50**, 47–59 (1957a). — Das Chondriom von *Polystictus versicolor* Film HF 201 (1957b).

HOUWINK, A. L.: A macromolecular mono-layer in the cell wall of *Spirillum* spec. *Biochim. et Biophysica Acta* **10**, 360 (1953). — Flagella, gas vacuoles and cell-wall structure in *Halobacterium halobium*; an electron microscope study. *J. Gen. Microbiol.* **15**, 146–150 (1956).

KELLING, H. W., u. F. SCHLEICH: Elektronenmikroskopische Studien an hautpathogenen Pilzen. *Arch. f. Dermat.* **199**, 33–46 (1954).

NEWMAN, S. B., E. BORYSKO and M. SWERDLOW: New sectioning techniques for light and electron microscopy. *Science* (Lancaster, Pa.) **110**, 66 (1949). — NIKLOWITZ, W.: Über die Herstellung von Ultradünnschnitten mit einer Uhrmacherdrehbank. *Mikroskopie* (Wien) **10**, 401–403 (1955).

PALADE, G. E.: Study of fixation for electron microscopy. *J. of Exper. Med.* **95**, 286 (1952).

SALTON, M. R. J., and R. C. WILLIAMS: electron microscopy of the cell wall of *Bacillus megaterium* and *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim. et Biophysica Acta* **14**, 455 (1954). — SJÖSTRAND, F. S., and V. HANZON: Membrane structures of cyto-

plasm and mitochondria in exocrine cells of Mouse pancreas as revealed by high resolution electron microscopy. *Exper. Cell. Res.* **7**, 393—414 (1954). — STRUGGER, S.: Schraubig gewundene Fäden als sublichtmikroskopische Strukturelemente des Cytoplasmas. *Ber. dtsh. bot. Ges.* **70**, 91—108 (1957).

TSUDA, S.: Electron microscopical studies of ultra-thin sections in *Aspergillus*, *Penicillium* and *Neurospora*. *Indian Phytopath.* **8**, 83 -93 (1955). — Electron microscopical studies of ultra-thin sections in *Penicillium chrysogenum*. *J. Bacter.* **71**, 450—453 (1956). — TURIAN, G., and E. KELLENBERGER: Ultrastructure du corps paranucléaire, des mitochondries et de la membrane nucléaire des gamètes d'*Allomyces macrogynus*. *Exper. Cell. Res.* **11**, 417—422 (1956).

WOHLFARTII-BOTTERMANN, K. E.: Die Feinstruktur der Mitochondrien von *Paramecium caudatum*. *Z. Naturforsch.* **11b**, 578—581 (1956). — Cytologische Studien IV. Die Entstehung, Vermehrung und Sekretabgabe der Mitochondrien von *Paramecium*. *Z. Naturforsch.* **12b**, 164—167 (1957).

YAMAMOTO, T., and M. KITAMURA: Electron microscopy of Yeast VI. On the investigation of taxonomy of Yeast (No 1). *Electron micr. Japan* **3**, 46—49 (1953).

(Aus dem Hygiene-Institut der Universität Bonn, Med.-parasitol. Abteilung)

Bau, Verhalten und Bedeutung der kernäquivalenten Strukturen bei *Oscillatoria amoena* (Kütz.) Gomont *

Von

GEORG WOLFGANG FUHS

Mit 37 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Juli 1957)

In der Cyanophyceenzelle konnten bisher folgende Einschlüsse mit Sicherheit nachgewiesen werden: 1. Eine zweischichtige Membran (FRITSCH 1905) sowie Scheiden und Gallerten, 2. ein lichtoptisch homogenes, Pigmente und Ribonucleinsäure enthaltendes Cytoplasma (GUILLIERMOND 1906, NEUGNOT 1951), 3. feulgenpositive, kernäquivalente Strukturen (POLJANSKY u. PETRUSCHEWSKY 1929, GUILLIERMOND 1933, SPEARING 1937, CASSEL u. HUTCHINSON 1954), 4. Polyphosphatkörper (sog. Volutingrana oder metachromatische Körper), die in ihrem Gehalt an Polyphosphatanionen den entsprechenden Zelleinschlüssen vieler niederen Pflanzen und Protozoen ähnlich sind (EBEL 1952, EBEL u. COLAS 1954), 5. Cyanophycinkörner (BORZI 1887), 6. Vacuolen, Gasvacuolen, Polysulfidtropfen und Gipskristalle.

Über die Existenz eines morphologisch erfaßbaren Kernäquivalents bei den Cyanophyceen besteht heute kein ernsthafter Zweifel mehr (vgl. z. B. GEITLER 1942, HARTMANN 1953). Ebenso herrscht Einigkeit darüber, daß ein typischer, Chromosomen bildender Zellkern hier nicht existiert. Unklarheit besteht allein über den Bau dieses Kernäquivalents, sein Verhalten bei der Teilung und seine Beziehung zum echten Nucleus. In den folgenden Ausführungen soll versucht werden, einen Teil dieser Fragen zu beantworten.

Die im folgenden zu besprechenden Strukturen sind mit den in der Literatur als „Zentralkörper“ oder „Chromidialapparat“ bezeichneten identisch. Es handelt sich um ein Zellorgan, das in jeder intakten Cyanophyceenzelle vorhanden ist und — nach der heutigen Vorstellung — in physiologisch jungen Zellen einen geschlossenen, zentralen Komplex bildet, sich jedoch in älteren Zellen in Einzelstücke auflösen kann, die sich dann im Plasma verteilen (GUILLIERMOND 1906, 1926). Es liegt dabei in den jüngeren Zellen nicht ein vom übrigen Plasma scharf und glattrandig

* Aus einer Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 1956.

abgesetztes, einheitliches Gebilde vor, wie der Name Zentralkörper glauben machen könnte, sondern ein fädiges Geflecht, das vom normalen Cytoplasma durchdrungen ist (GEITLER 1936). Die Frage, ob dieses Material nur verschlungen oder echt vernetzt ist, wird meist im zweiten Sinne entschieden (POLJANSKY u. PETRUSCHEWSKY 1929). Ebenso erwähnen mehrere Autoren granuläre Beimengungen oder daß die Fäden des Geflechtes granulabesetzt seien (SPEARING 1937). Die fädigen Elemente des Zentralkörpers liegen in fadenbildenden Cyanophyceen meist in der Längsrichtung des ganzen Organismus orientiert. Bei der Zellteilung soll eine Streckung des netzartigen Gebildes in die Länge und eine anschließende Querdurchschnürung stattfinden (POLJANSKY u. PETRUSCHEWSKY 1929, SPEARING 1937, NEUGNOT 1951). GUILLIERMOND (1925), SPEARING (1937) und KRIEG (1954) fanden in manchen Arten stabförmige Elemente des Zentralkörpers, die sich bei der Zellteilung ebenfalls querteilen sollten (sog. „Haplomitose“ im Sinne von GUILLIERMOND, MANGENOT u. PLANTEFOL 1933). Jedenfalls aber teilt sich der Zentralkörper aktiv und wird nicht von der sich bildenden neuen Querwand passiv durchgeschnitten (HAUPT 1923, SPEARING 1937).

Nach POLJANSKY u. PETRUSCHEWSKY (1929), NEUMANN (1930), PETTER (1933), SPEARING (1937), CASSEL u. HUTCHINSON (1954) sowie anderen ist der Zentralkörper feulgenpositiv. Nach NEUGNOT kann seine Basophilie durch Ribonuclease nicht aufgehoben werden.

Diese Feststellungen rechtfertigen es, dieses Strukturelement der Cyanophyceenzelle zumindest vom physiologischen und cytochemischen Standpunkt aus als Kernäquivalent aufzufassen.

Der Name „Zentralkörper“ soll aus den angeführten Gründen auf den folgenden Seiten vermieden werden, ebenso wie der vielfach verwendete Name „Chromidialapparat“, der von R. HERTWIG geprägt und von GUILLIERMOND (1906) übernommen wurde und, wie wir heute wissen, Fadenstrukturen bezeichnet, die Ribonucleinsäure, aber niemals Desoxyribonucleinsäure enthalten. Es soll daher vorläufig von dem „Chromatinapparat“ („chromatic apparatus“ SPEARING) bzw. von einzelnen „Chromatinelementen“ gesprochen werden.

Ältere Auffassungen über die Natur des Chromatinapparates, die von der vorgetragenen abweichen, sollen hier nicht referiert werden, soweit sie uns durch andere Untersucher inzwischen ausreichend widerlegt erscheinen. Im einzelnen sei auf die Zusammenfassungen von FRITSCH (1945), DRAWERT (1949) und SCHUSSNIG (1953) verwiesen. Kurz erwähnen müssen wir dagegen die Arbeiten von BRINGMANN (1950), HERBST (1953, 1954) und VON ZASTROW (1953). (Eine ausführlichere Stellungnahme findet sich bei FUHS 1956 a, b.)

BRINGMANN bestreitet die Existenz eines feulgenpositiven Chromatinapparates im oben angeführten Sinne. Träger der Ribo- und Desoxyribonucleoproteide sind nach seiner Auffassung die Polyphosphatgrana als sog. Karyoide. BRINGMANN stützt sich hierbei im wesentlichen auf die Färbbarkeit dieser Grana mit Methylgrün, Pyronin und fuchsin-schweflicher Säure. Die Arbeiten von HERBST enthalten sehr ähnliche Gedankengänge.

VON ZASTROW dagegen beschreibt ein dem Chromatinapparat ähnliches Gebilde („Zentralsubstanz“) als Bestandteil aller Zellen, das sie mit basischen Farbstoffen, insbesondere Fluorochromen, darstellen konnte, das aber im Gegensatz zum echten Chromatinapparat nicht als fädiges Geflecht, sondern mehr als eine plumpe Masse erscheint, die in älteren Zellen in Grana zerfallen soll.

Material

Für die Untersuchungen wurde in erster Linie die Art *Oscillatoria amoena* (Kützling) Gomont verwendet, daneben auch *Gloeothece* spec. und *Nostoc* spec. Orientierende Beobachtungen erstreckten sich auch auf *Lyngbya stagnina* Kütz., *Phormidium tenue* (Menegh.) Gom. und *Pseudanabaena catenata* Lauterb. Während wir *Oscillatoria amoena* und *Nostoc* spec. nach den Angaben von CASSEL u. HUTCHINSON (1954) im rein mineralischen Nährmedium kultivierten, standen die anderen Arten nur in Rohkulturen zur Verfügung.

Die Kulturlösung nach CASSEL u. HUTCHINSON hat folgende Zusammensetzung: CaCl_2 0,05 g; KNO_3 0,25 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,0025 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; K_2HPO_4 0,1 g; Spurenlösung (s. u.); Aq. redest. ad 1000,0 ml. Die bei CASSEL u. HUTCHINSON angegebene Spurenlösung nach HOAGLAND und ARNON bewährte sich — vielleicht wegen des fehlenden Kupfers — auf die Dauer nicht, sie wurde daher durch die Lösung nach WALL, WAGENKNECHT, NEWTON u. BURRIS (1952) ersetzt: H_3BO_3 572 mg; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 247 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 19,6 mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 1,8 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 439 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 450 mg; Aq. dest. ad 1000,0 ml; davon je 2,0 ml auf 1000 ml Kulturlösung.

Die Kulturen wurden im Dauerlicht gehalten (25-W-Glühlampe in 25–30 cm Abstand). Die Temperatur im Kulturschrank lag zwischen 26 und 28° C, der pH -Wert der Nährlösung stieg während der Kultur von 7,4 auf 9,0 bei deutlicher Entkalkung des Mediums.

Für die Versuche wurde, soweit nichts anderes vermerkt ist, nur „physiologisch junges“ Material herangezogen, d. h. Algen aus jungen, kräftig wachsenden Kulturen. Insbesondere sollten die Zellen nicht vacuolisiert sein, wie es bei Cyanophyceen aus alten Kulturen häufig der Fall ist (GUILLIERMOND 1926, VON ZASTROW 1953).

Methoden

I. Methoden zur Darstellung der kernäquivalenten Strukturen

A. Fluorochrome

Von den Fluorochromen wurden folgende Farbstoffe verwendet:

1. Orientierende Versuche mit Acridinorange (Merck), Auramin (Merck), Acridingelb extra (Hollborn), Trypaflavin unbekannter Herkunft, Thioflavin (Grübler und Bayer), Coriphosphin (Hollborn), Primulin (Bayer) und Thiazolgelb (Grübler). Die Farbstoffe wirkten jeweils in der Verdünnung von 1:10 000 20 min lang auf die unfixierten Zellen ein.

2. Acridinorange (Merck) 1:10 000 bis 1:100 000 in m/150 Phosphatpuffer von pH 4,0–8,0 (optimal pH 6,6), 15 min.

3. Auramin (Merck) 1:10 000 in m/150 Phosphatpuffer von pH 4,0–8,0, 15 min. Deutlichste Färbung bei pH 6,5–7,5 oder mit ungepufferter Lösung.

4. Trypaflavin unbekannter Herkunft, Anwendung wie unter 2., pH ohne Einfluß zwischen 4,0 und 8,0.

5. Berberinsulfat (Grübler oder Bayer), Anwendung wie unter 2., deutlichste Färbung bei pH -Werten zwischen 6,5 und 8,0 oder mit ungepufferter Lösung.

B. Verfahren mit Salzsäure-Hydrolyse

6. Nuclealreaktion nach FEULGEN. Als gut geeignete Fixiermittel erwiesen sich: Alkohol 96%, Sublimat in gesättigter, wäßriger Lösung, Sublimatalkohol nach SCHAUDINN (bei Zimmertemperatur angewendet) und das Gemisch nach CHABAUD [80%iger Alkohol 60 ml, Phenol krist. 15 g, Formalin 5 ml, Eisessig 2 ml (BOIVIN, VENDRELY, TULASNE u. MINCK 1947)]. Ebenfalls brauchbar war das sog. MF-Gemisch [Methanol 90 ml, 40%iges Formalin 10 ml (MURRAY 1953)] sowie die meisten anderen Fixiergemische, soweit sie nicht wegen ihres Bichromatgehaltes eine Polysaccharidreaktion (nach BAUER u. FEULGEN) einleiten. Die Fixierungsdauer betrug in allen Fällen 15 min.

Eine optimale Hydrolyse in nHCl bei 60° C dauerte nach Fixierung in Alkohol, Sublimatlösung, Sublimatalkohol und nach CHABAUD 10 min, nach Sublimatessig 8 min. Anschließend wurde kurze Zeit in kalter nHCl, dann in Aq. dest. gespült und für 3 Std in fuchsin-schweflige Säure überführt (bereitet aus Parafuchsin 1 g, Aq. dest. 200 ml, nHCl 20 ml und NaHSO₃ sicc. 1 g). Zuletzt wurde dreimal je 5 min in SO₂-haltigem Wasser gespült.

Beobachtet wurde in Wasser oder nach Passieren der Alkoholreihe in Caedax. Im letzten Falle empfiehlt sich eine vorherige Gegenfärbung mit Alizarinviridin, die die Zellumrisse besser hervortreten läßt.

7. Salzsäure Hydrolyse — Giemsa. Es wurde nach folgendem Schema vorgefahren: Fixierung nach CHABAUD 15 min; Wässerung unter fließendem Wasser 3 min; Hydrolyse in nHCl bei 60° C 10 min; Wässerung unter fließendem Wasser 5 min; Färbung in Giemsalösung, 1:60 mit Pufferlösung nach WEISE (pH 7,2) verdünnt, 2 Std; Auswaschen und Eindecken in Pufferlösung, Paraffinumrandung.

8. Salzsäure Hydrolyse — Giemsa — Tannin. Durchführung wie unter 7., aber im Anschluß an die Färbung wurde mit 10%iger Tanninlösung 20 min differenziert und nach gründlichem Auswaschen in Pufferlösung eingedeckt.

C. Färbung mit basischen Farbstoffen ohne vorausgegangene Hydrolyse

9. Basisches Fuchsin. Fixierung nach CHABAUD; Fuchsin basisch in 0,1%iger wäßriger Lösung 15 min; Alkoholpassage binnen 5 min, Xylol, Caedax.

10. Giemsafärbung. Verfahren wie unter 7., aber ohne Hydrolyse.

11. Carminessigsäure, ohne vorangehende Fixierung und ohne Erwärmen angewendet.

12. Brillanteresylblauessigsäure nach STEWART u. SCHERTIGER (1949). Alkohol-Eisessig (3:1 oder 2:1) 3 min; Alkohol 70% 2 min; Brillanteresylblauessigsäure 5 min (die Farblösung wird hergestellt, indem man 2% Brillanteresylblau ohne Erwärmen in 45%iger Essigsäure löst); Alkohol 70% (2 min), dann eindecken in Wasser.

13. Methylgrünessigsäure nach STRASBURGER, ohne Fixierung oder nach Fixierung in Alkohol oder Formol angewendet.

14. Pyronin G in 1%iger wäßriger Lösung nach Alkohol- oder Formolfixierung.

D. Die Anwendung von Fermenten (Nucleasen und Proteasen)

15. Ribonuclease — Giemsa. Fixiergemisch nach CHABAUD 15 min; Wässerung unter fließendem Wasser 60 min; Ribonuclease krist. (Armour, Chicago) in 0,02%iger Lösung in m/15 Phosphatpuffer (pH 6,0) bei 37° C 10–60 min, optimal 20 min; Wässerung in Aq. dest.; Giemsafärbung und Einschluß wie unter 7.

16. Ribonuclease — Pepsin — Giemsa. Fixierung und Abbau mit Ribonuclease wie unter 15., Pepsin (Merck) in 0,02%iger Lösung in n/100 HCl bei 37° C 30 min; Wässerung in fließendem Wasser 15 min; Giemsafärbung und Einschluß wie unter 7.

16a. Entwässerung nach Giemsaefärbung, wenn notwendig, in Aceton-Xylol (1:1) 3 min, dann Xylol und Übergang in Caedax.

16b. Entwässerung nach Giemsaefärbung in schonenderer Form: Beizung des nach GIESMA gefärbten Präparates in 5%iger Phosphomolybdänsäurelösung für 5 min, Entwässerung über Alkoholstufen, dann Xylol und Übergang in Caedax.

17. Desoxyribonuclease - GIESMA. Fixiergemisch nach CHABAUD 15 min; Spülung unter fließendem Wasser 60 min; Desoxyribonuclease krist., proteasefrei (Worthington Inc., Freehold N. J., USA) in 0,02%iger Lösung in m/15 Phosphatpuffer (p_H 6,0) mit Zusatz von 0,05 m $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ als Aktivator, 120 min bei 37° C unter Wechseln der Fermentlösung nach 15, 30 und 45 min (JACKSON u. DESSAU 1955); Abspülen in Wasser; Giemsaefärbung und Einschluß wie unter 7.

18. Desoxyribonuclease - Ribonuclease - GIESMA. CHABAUD-Fixierung und Abbau mit Desoxyribonuclease wie unter 16., Abbau mit Ribonuclease wie unter 15. und Färbung wie unter 7.

19. Ribonuclease - Galloeyanin-Indiumalaun. Fixierung und Fermenteinwirkung wie unter 15.; Galloeyanin-Indiumalaun, hergestellt nach der Vorschrift von BAIR (1953), Einwirkungszeit mindestens 40 Std bei 37° C; Beobachtung in Wasser.

20. Ribonuclease - Pepsin - Galloeyanin-Indiumalaun. Durchführung wie unter 19., aber im Anschluß an die Ribonucleaseeinwirkung Abbau mit Pepsin wie unter 16. in den Prozeß eingeschoben.

21. Diastase - Ribonuclease - Pepsin. Diastase (Merck) (0,2%ige Lösung in Aq. dest.) 24 Std bei 50° C, Ribonuclease wie unter 15.; Pepsin wie unter 16.; Aufbringen des zerzupften Materials auf Formvar-befilmte Netzblenden für das Elektronenmikroskop.

22. Diastase - Ribonuclease - Pepsin - Galloeyanin-Indiumalaun. Durchführung wie unter 21., aber im Anschluß an die Pepsineinwirkung Färbung mit Galloeyanin-Indiumalaun wie unter 19.

Pufferkontrollen zu diesen Versuchen: An Stelle der Fermentlösungen wurden gleiche Präparate mit fermentfreien Pufferlösungen behandelt. Diese Kontrollen wurden beim Arbeiten mit Desoxyribonuclease und bei den Präparationen für das Elektronenmikroskop stets, in den übrigen Fällen nur bei der Einarbeitung des betreffenden Verfahrens mitgeführt.

II. Verfahren zur Darstellung der Polyphosphatgrana

23. Volutinfärbung nach MEYER (1904) mit Methylenblau und 1%iger Schwefelsäure. Die Polyphosphatkörper erscheinen tiefblau.

24. Bleifällung bei p_H 1 nach EBEL u. COLAS (1954). Fixierung mit Alkohol oder Formol; 10% $Pb(NO_3)_2$ gelöst in n/10 HNO_3 15 min; Spülen in fließendem Wasser 15 min; farbloses Ammonsulfid 3 min; die Phosphatkörper erscheinen schwarz.

25. Fuchsin-schweflige Säure ohne vorangehende Hydrolyse. Das Reagens wurde dargestellt, wie unter 6. beschrieben. Die Einwirkungszeit betrug Minuten bis Stunden; die Polyphosphatkörper erscheinen tiefrot.

III. Beobachtung

Für die mikroskopische Beobachtung und photographische Wiedergabe stand ein Leitz-Apochromat (n. A. 1,40) mit Periplanokularen zur Verfügung, für die Phasenkontrastbeobachtung eine Einrichtung von Zeiss-Winkel. Die Photographien besitzen im allgemeinen einen Abbildungsmaßstab im Plattennegativ von 1200:1 bis 1300:1 und sind nachvergrößert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind mit einem Philips-75-kV-Elektronenmikroskop auf Kleinbildfilm aufgenommen.

Eigene Befunde

Da die Ergebnisse cytologischer Forschung weitgehend von den angewendeten Methoden abhängig sind, werden im folgenden die Beobachtungen geordnet nach den Untersuchungsverfahren mitgeteilt. Dabei war es nicht zu vermeiden, sogleich manche Publikationen der letzten Jahre kritisch zu diskutieren.

Vitalbeobachtungen im Hellfeld

Die Beobachtungen lebender Zellen von *Oscillatoria amoena* wie auch der anderer fädig wachsenden Formen ließen den Chromatinapparat als weniger stark gefärbten Zentralbereich in jeder Zelle erkennen (Abb. 1).

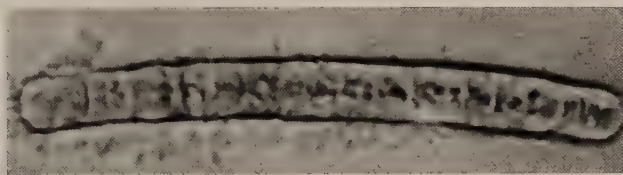


Abb. 1. *Oscillatoria amoena*, keimendes Hormogonium aus einer Deckglaskultur. Der Faden ist mit Bakterien besetzt. 1920:1

Der Chromatinapparat war stets mehr oder weniger zerklüftet. Er erschien an den Längsseiten verhältnismäßig glatt begrenzt, an den den Querwänden zugekehrten Seiten stets mit Ausläufern versehen, und zwar reichten die Ausläufer im allgemeinen bis an die Querwände heran (vgl. a. NADSON 1895). Der Chromatinapparat selbst war nie homogen, sondern stets strukturiert. Diese Strukturen liefen vornehmlich in der Längsrichtung der Trichome.

Diese verhältnismäßig dicht geschlossene Form des Chromatinapparates lag nur in jüngeren, unvacuolisierten Zellen vor. Material aus älteren Kulturen zeigte dagegen Zellen, die im ganzen schwach marmoriert erschienen. Gleichzeitig hinderte die zunehmende Polyphosphat-speicherung („Metachromatin“ s. u.) die genauere Analyse am ungefärbten Präparat. Dieser gewisse Formwechsel des Chromatinapparates ist bereits bei GUILLIERMOND (1906, 1926) beschrieben.

Vitalbeobachtungen im Phasenkontrast

Im Phasenkontrastmikroskop erschien der Chromatinapparat in jüngeren Zellen ganz so wie bei CASSEL u. HUTCHINSON (1954) beschrieben. Er stellte eine unscharf begrenzte, nicht von Diffraktionsräumen umgebene aufgehellte Zone dar, die in ihrer Ausdehnung mit der im Hellfeldbild erkennbaren übereinstimmte (Abb. 2).

Fluorochromierung (Methoden Nr. 1—5)

Die Fluorochromierungsversuche wurden an allen im Abschnitt „Material“ genannten Arten, und zwar an Fäden verschiedenen Kulturalters

wiederholt. Fluorochromiert wurde mit Acridinorange, Auramin, Trypaflavin und Berberinsulfat. Wir waren bestrebt, den Fluoreszenzeffekt nicht an Zeichnungen, sondern an Photographien festzuhalten. Da die Fluoreszenzfarbe des Acridinorange rasch in rot umschlug und Trypaflavin eine goldgelbe Fluoreszenz ergab, wurde für die Aufnahmen nur mit den grüngelb fluorescierenden Farbstoffen Auramin und Berberinsulfat gearbeitet. Alle diese basischen Fluorochrome markierten die

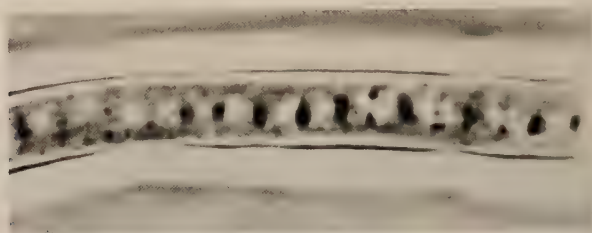


Abb. 2. *Oscillatoria amoena*, lebender Faden aus junger Kultur im Phasenkontrastmikroskop. Die hellen Zonen deuten die Lage des Chromatinapparates an, die dunklen Grana sind Cyanophycinkörner. 2080:1

„Zentralsubstanz“ (VON ZASTROW), d. h. den Chromatinapparat. Mit Ausnahme des Berberinsulfats färbten sie auch die Membranen und die später zu besprechenden Polyphosphatkörper. Die Cyanophycinkörner, die VON ZASTROW mit Trypaflavin darstellen konnte, nahmen keinen unserer Farbstoffe an.

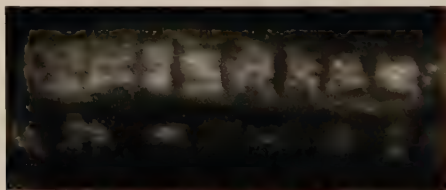


Abb. 3. *Oscillatoria amoena*, Fäden aus junger Kultur, fluorochromiert mit Berberinsulfat. Nur die Chromatinapparate fluorescieren. 2100:1

Wie Abb. 3 für *O. amoena* zeigt und die Beobachtungen an den anderen Arten bestätigen, besitzt der Chromatinapparat keineswegs ein grobes, klumpiges Aussehen, wie bei VON ZASTROW (1953) angegeben. Er fluoreszierte in keinem Falle gleichmäßig, erschien aber auch nicht völlig unregelmäßig marmoriert, sondern in meist parallel zur Längsrichtung des Fadens verlaufenden Strukturen. Er war stets mehr oder weniger zerfetzt und verfügte über fädige Ausläufer, vor allem zu den Querwänden hin. In älteren Zellen lagen die Bestandteile des Zentralkörpers in der Zelle zerstreut, aber sie waren nicht als Brocken wie bei VON ZASTROW ausgebildet, sondern stets als Stücke feiner Fäden, wie bereits

bei GUILLIERMOND (1926) beschrieben. Die Identität der „Zentralsubstanz“ (VON ZASTROW) mit dem Zentralkörper GUILLIERMONDS ergibt sich besonders deutlich, wenn man die Abb. 25 aus VON ZASTROWS Arbeit (*Anabaena variabilis* mit Vacuolen) mit der Abb. 7 bei GUILLIERMOND (1926) vergleicht, in der vacuolisierte Fäden von *Schizothrix mülleri* dargestellt sind. KRIEG (1954) entscheidet sich an Hand seiner Fluoreszenzaufnahmen ebenfalls für die Auffassung GUILLIERMONDS.

Nach VON ZASTROW zerfällt die „Zentralsubstanz“ in alten Zellen in kugelige Grana. Da die Autorin aber in den von ihr untersuchten Arten kein „Metachromatin“ nachgewiesen hat, war zu prüfen, ob diese „Zentralsubstanzgrana“ nicht etwa Polyphosphatgrana (das „Volutin“ oder



Abb. 4

Abb. 4. *Oscillatoria amoena* aus alter Kultur, mit Auramin fluorochromiert. Chromatinapparat, Polyphosphatgrana und Membran fluoreszieren. 2080:1

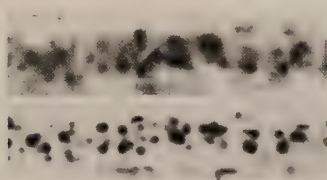


Abb. 5

Abb. 5a und 5b. *Oscillatoria amoena* aus alter Kultur. Derselbe Faden (oben) nach Fluorochromierung mit Auramin (Negativkopie!) und (unten) nach der Volutinfärbung nach MEYER. Wie trotz leicht verschiedener Einstellebenen zu erkennen ist, sind in beiden Fällen die gleichen Grana dargestellt. Kleinbildaufnahmen 1800:1

„Metachromatin“ der älteren Autoren) darstellen, zumal da sich die Polyphosphatgrana infolge ihrer ungewöhnlich hohen Basophilie (vgl. a. DRAWERT 1949) mit basischen Fluorochromen sehr leicht darstellen lassen (Acridinorange: KRIEG 1953, BORCHERT u. HELMCKE 1950; Auramin: KÖLBEL 1953). Außerdem erscheinen Polyphosphatkörper in Algen aus älteren, gut geführten Kulturen besonders zahlreich (ZUELZER 1911, PRAT 1925).

Wie bereits erwähnt, sahen wir in unseren Präparaten, daß der Chromatinapparat in älteren Zellen in fädige Stücke zerfiel. Daneben waren aber meist Grana zu erkennen, die sich vom Chromatinapparat durch ihre viel intensivere Fluoreszenz unterschieden. Diese Grana waren oft so zahlreich, daß sie den Chromatinapparat verdeckten (Abb. 4). Wenn wir identische Stellen solcher Präparate zum ersten Male nach der Fluorochromierung und zum zweiten Male nach einer anschließenden Volutinfärbung nach MEYER (Verfahren Nr. 23, s. o.) photographierten (Abb. 5a u. 5b), so erwiesen sich alle „Zentralsubstanzgrana“ als Polyphosphatkörper.

Nuclealreaktion nach Feulgen (Verfahren Nr. 6, s. o.)

Die Nuclealreaktion nach FEULGEN u. ROSSENBECK (1924) gehört heute noch zu den zuverlässigsten qualitativen Verfahren zum Nachweis der Desoxyribonucleinsäure (DNS) in situ (vgl. a. die Übersicht von LESSLER 1953).

Ein Zellbestandteil gilt als nuclealpositiv und damit DNS-haltig, wenn er weitgehend unabhängig vom Fixiermittel und auch nach 24stündiger Alkoholeinwirkung, aber nur nach einer vorausgegangenen Hydrolyse mit fuchsinschwefliger Säure die charakteristische Rotfärbung ergibt.

Beim Arbeiten mit Cyanophyceen muß aber noch der Umstand beachtet werden, daß die Polyphosphatkörper mit fuchsinschwefliger Säure ohne vorangegangene Hydrolyse eine intensive Rotfärbung ergeben (Abb. 6). Dieses Färbeergebnis ist aber nicht eine FEULGEN-Reaktion auf

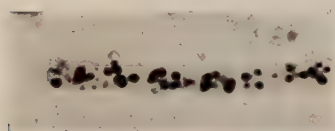


Abb. 6. *Oscillatoria amoena*, Faden aus alter Kultur, Fuchsinschweflige Säure ohne Hydrolyse.
Polyphosphatgrana. 1300:1

„locker gebundene DNS“, wie BRINGMANN (1950) annahm, sondern eine unspezifische Adsorptionserscheinung, die auch mit synthetischem Polyphosphat und anderen stark adsorbierenden Substanzen gelingt. Durch eine mindestens 7 min dauernde Hydrolyse in nHCl von 60° C, wie sie einen Bestandteil der Nuclealreaktion darstellt, werden die Poly

phosphatkörper jedoch nahezu völlig hydrolysiert und stören dann nicht mehr. BRINGMANN glaubte die „locker gebundene DNS mit Lanthansalzen fällen“ zu können und erreichte nach dieser Vorbehandlung eine FEULGEN-Reaktion an den Phosphatkörpern nach regulärer Hydrolysezeit. Wenn wir in eigenen Versuchen vor der Hydrolyse 15 min lang eine 2 prozentige Lanthanacetatlösung auf die Zellen einwirken ließen, so waren die Phosphatkörper erst nach 12 min Hydrolyse anstatt nach 7—8 min abgebaut. Schwerlöslichkeit der Lanthanpolyphosphate ist hier die wahrscheinliche Ursache; denn in der normalen Zelle sind die Polyphosphatanionen durch eine entsprechende Anzahl von Kaliumionen neutralisiert, wie SCHMIDT HECHT u. THANNHAUSER (1949) an *Hefe* feststellen konnten. Auch EBEL (1952) mußte nach einer Bariumfällung der Polyphosphatanionen länger hydrolysieren als ohne diese.

Die Nuclealreaktion gelang an Cyanophyceen optimal nach den gleichen Fixierungen, die schon POLJANSKY u. PETRUSCHEWSKY (1929) als besonders geeignet angegeben hatten (s. o.). Der Kontrast war in seiner Stärke nicht mit dem an den gröberen Kernstrukturen höherer Organismen erzielbaren zu vergleichen, aber in der Masse der Zellen bereits makroskopisch zu erkennen, bei Grünfilterung recht gut zu untersuchen und auf orthochromatischem Negativmaterial sehr gut zu photographieren (Abb. 7). Man erkennt in den normal gestalteten Zellen die Chro-

matinapparate in typischer Ausbildung als Bestandteile aller Zellen. Sie setzen sich offenbar aus linear gestalteten Elementen zusammen, die im wesentlichen in der Längsrichtung des ganzen Fadens angeordnet sind. Über Feinstruktur und etwaige Vernetzung der Elemente kann jedoch nichts ausgesagt werden. Auffällig ist ein gewisses granuläres Element. Die einzelnen Fasern des Chromatinapparates erscheinen mit Grana besetzt oder an den Enden zu Grana angeschwollen. Noch bemerkenswerter sind jedoch Formen, wie sie die Abb. 8 zeigt. Diese und ähnliche Bilder wurden nach Alkohol-, Methanol-Formalin- und CHABAUD-Fixierung erhalten. Ein Teil der Chromatinapparate erschien als kompakte, zentral gelagerte Masse, teilweise wie in Teilung

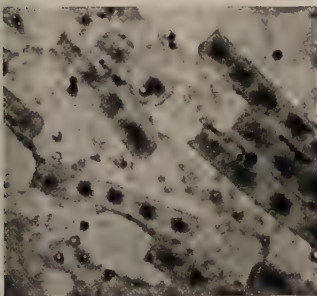


Abb. 7. *Oscillatoria amoena*,
Nuclealreaktion, 1400:1

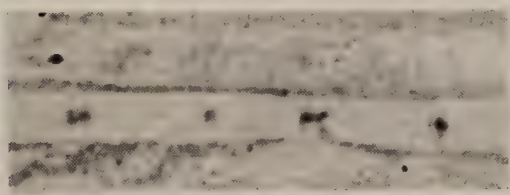


Abb. 8. *Oscillatoria amoena*,
Nuclealreaktion, 2240:1

begriffen. In den übrigen Zellen waren bei extremer Ausbildung dieses Typs die Chromatinapparate in Granulaanhäufungen aufgelöst. Auf die Deutung dieser Erscheinung wird weiter unten eingegangen werden.

Salzsaure Hydrolyse—Giemsaefärbung (—Tannin) *Verfahren Nr. 7 und 8*

Die salzsaure Hydrolyse, wie sie bei der FEULGEN-Reaktion angewendet wird, übt noch eine weitere Wirkung aus. Sie eliminiert nämlich die plasmatische Ribonucleinsäure (RNS) durch Depolymerisation (VENDRELY u. LIPARDY 1946, VENDRELY-RANDEVEL 1949 a, b, POUYET 1949), so daß die Plasmabasophilie aufgehoben wird. In ähnlicher Weise werden auch die stark basophilen Polyphosphatkörper abgebaut. So bleibt die DNS als meist einziger basophiler Zellbestandteil zurück und kann mit basischen Farbstoffen elektiv hervorgehoben werden. Dieses Verfahren, das PIEKARSKI (1937) erstmalig zur Ergänzung der Nuclealreaktion angewendet hatte, wurde an Cyanophyceen von NEUGNOT (1951) und in der Variante mit Tannindifferenzierung (CASSEL 1951) auch von CASSEL u. HUTCHINSON (1954) verwendet.

Das Ergebnis deckte sich in großen Zügen mit den Befunden von CASSEL u. HUTCHINSON (1954). Gegenüber den FEULGEN-Präparaten waren die Kontraste stark erhöht, die morphologische Erscheinung blieb jedoch

die gleiche. Auch hier erschienen die linearen Elemente des Chromatinapparates granulabesetzt oder in Granula umgewandelt (Abb. 9).

Vergleicht man diese Beobachtungen mit den bisher von den Autoren an Hand der FEULGEN-Reaktion und der HCl-Giemsa-Färbung veröffentlichten Ergebnissen, so zeigt sich eine gute Übereinstimmung und ein gewisser Unterschied gegenüber den Ergebnissen, die mit Methoden ohne Hydrolyse gewonnen wurden. Diese Differenzen sind gleichzeitig von der Fixierungsmethode unabhängig; denn CASSEL u. HUTCHINSON arbeiteten mit Osmiumtetroxyd, POLJANSKY u. PETRUSCHEWSKY mit Sublimatgemischen, wir selbst darüber hinaus mit Alkohol und der Flüssigkeit nach CHABAUD.

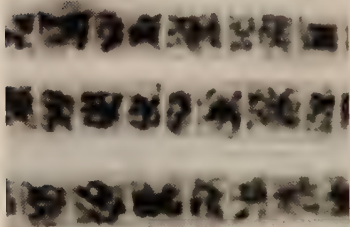


Abb. 9. *Oscillatoria amoena*,
HCl-Giemsa, 2080:1

Die nach einer sauren Hydrolyse allgemein zu beobachtende Verklumpung und Abkugelung des Chromatinapparates oder seiner Bestandteile, also eine Viscositätsminderung seines Materials, sind vielleicht bei Strukturen dieser Feinheit bereits der sichtbare Ausdruck der Hydrolyse im molekularen Bereich, einer Hydrolyse, deren oft zitierte Milde

sich nur auf den nicht sehr weitgehenden chemischen Abbau des DNS-Moleküls bezieht, die Trägerstrukturen aber mehr oder weniger stark beeinflussen kann. Auch LI u. STACEY (1949) vermuten einen Einfluß der salzsauren Hydrolyse auf feine mikroskopische Strukturen.

Basische Farbstoffe ohne vorhergehende Hydrolyse (Verfahren Nr. 9—14)

Ließen wir auf *O. amoena* nach CHABAUD-Fixierung Giemsa Farbstoff ohne Hydrolyse einwirken, so erhielten wir gegenüber dem Hydrolyseverfahren ein ganz anderes Bild.

Nach JACOBSON u. WEBB (1952) färben sich Desoxyribonucleoproteide mit Giemsa Farbstoff rot, Ribonucleoproteide blau. In den Cyanophyceen erschienen daher die Chromatinstrukturen durch die hohe Basophilie des RNS-haltigen Plasmas verdeckt, nur die Phosphatkörper traten, wo sie vorhanden waren, schwarzblau gefärbt hervor. Durch Photographie polyphosphatarmer Fäden auf orthochromatischem Negativmaterial bei stark verlängerter Belichtungszeit ließ sich jedoch der Roteffekt am Chromatinapparat sichtbar machen. Mit dem gleichen Kunstgriff ließ sich auch nach einfacher Fuchseinschmelzung der dunkelrote Chromatinapparat auf rotem Grund darstellen (Abb. 10). Hier waren keinerlei Klumpen oder Grana, sondern nur glatte, fädige Strukturen tief gefärbt dargestellt. Auch Carminessigsäure eignet sich zur Darstellung

des Chromatinapparates, wie schon HIERONYMUS (1892) feststellte. Dieses Zellorgan hob sich jedoch neben den rotgefärbten Cyanophycin-körnern nur schwach vom ebenfalls rotgetönten Cytoplasma ab, in der Photographie wird der Effekt wiederum verstärkt wiedergegeben

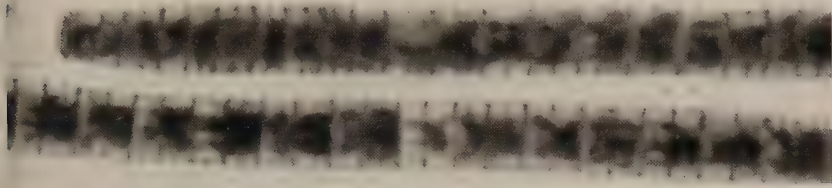


Abb. 10. *Oscillatoria amoena*, bas. Fuchsin ohne Hydrolyse, 2340:1

(Abb. 11). Hier erschien der Chromatinapparat aufgelöst in einzelne stab- oder fadenförmige Elemente, die parallel zur Fadenachse lagen. Die Fadenstücke erschienen in kurzen Zellen ebenso lang wie diese, in längeren Zellen kürzer als diese. Die verhältnismäßig gute Darstellung ist zugleich darauf zurückzuführen, daß die störenden Polyphosphatkörper von der Carminessigsäure gelöst wurden.

Den gleichen Vorzug, die Phosphatkörper zu eliminieren, besitzt auch die Brillanteresylblauessigsäure, die sich für die subjektive Beobachtung besser als die Carminessigsäure eignet. Ihre Wirkung gleicht im übrigen der Carminessigsäure. GUILLIERMOND fand 1906 an vital- und eisenhämatoxylingefärbten Präparaten,

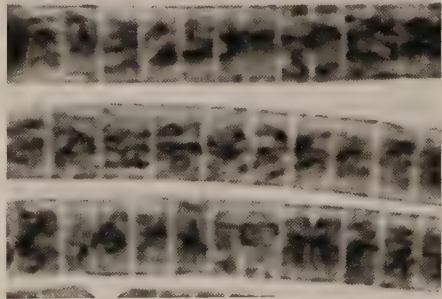


Abb. 11. *Oscillatoria amoena*, Carminessigsäure, 2340:1

daß in älteren und offenbar nicht mehr teilungsfähigen Zellen der „Chromidialapparat“ in einzelne Stücke zerfällt, die sich auf das ganze Zellvolumen regellos verteilen und evtl. zwischen den Vacuolen zerstreut liegen. In Brillanteresylblauessigsäure wurden nun in den eigenen Versuchen ausnahmsweise auch Zellen aus älteren, zum Stillstand gekommenen Kulturen untersucht und GUILLIERMONDs Beobachtungen bestätigt. Es zeigten sich dabei stabförmige Stücke des chromatischen Materials von offenbar gleicher Länge. Diese Länge entsprach etwa der kürzesten beobachteten Zelllänge.

Methylgrünessigsäure färbte in unseren Präparaten den Chromatinapparat und die Phosphatkörper, wie schon BÜTSCHLI (1890) angegeben hatte. Die Polyphosphatkörper erschienen weit kräftiger

gefärbt als das Kernäquivalent. Pyronin färbte das Cytoplasma rot und die Polyphosphatkörper schwarzrot. Beide Farbstoffe werden zuweilen als spezifisch für Nucleinsäuren angegeben (POLLISTER u. LEUCHTENBERGER 1949, KURNICK 1952 a, b). Da sich aber auch synthetisches Polyphosphat mit diesen Farbstoffen darstellen läßt (STICH 1953), sind sie wenn überhaupt, nur dann spezifisch für Nucleinsäuren, wenn die untersuchten Zellen frei sind von Polyphosphat (und sauren Polysacchariden, STICH) (vgl. a. WINKLER 1953). Die Färbung mit Methylgrün und Pyronin bietet also im Gegensatz zu den Auffassungen von BRINGMANN (1950), HERBST (1953, 1954) und VON ZASTROW (1953) weder in cytomorphologischer noch cytochemischer Hinsicht bei unseren Objekten einen Vorteil; von einer wirklichen Spezifität dieser Farbstoffe kann nicht die Rede sein.

Anwendung von Nucleasen und Proteasen

In zunehmendem Maße hat sich die kombinierte Anwendung von Fermenten und Farbstoffen bei der Analyse von Zellbestandteilen bewährt. Diese Verfahren boten die Möglichkeit, andere als spezifisch geltende Farbstoffe gerade im Hinblick auf ihre Spezifität zu prüfen. Dabei ergaben sich bemerkenswerte Resultate.

1. Ribonuclease — Giemsa (Verfahren Nr. 15)

Ribonuclease wurde von BRACHET (1940) zur Lokalisation von RNS und ihrer Differenzierung von DNS in die histologische Technik eingeführt. Ribonuclease wurde von KUNITZ (1940) kristallisiert erhalten, die Anwendung wurde von SANDERS (1946) und BOIVIN, TULASNE, VENDRELY u. MINCK (1947) beschrieben. Die letzten Autoren ermittelten das Chabaudsche Gemisch als besonders geeignetes Fixiermittel für Ribonucleasepräparationen. Statt des Giemsa Farbstoffes können auch andere basische Farbstoffe mit dem Ferment kombiniert werden. Das Ribonucleaseverfahren verbindet hohe Spezifität mit schonender Behandlung.

Wie bei NEUGNOT (1951), die dieses Verfahren an Cyanophyceen in geringem Umfange verwendete, konnte die Plasmabasophilie aufgehoben werden. Die Phosphatkörper blieben erhalten, wenn das Ferment — wie in den meisten Versuchen — 20 min einwirkte. Wenn die Phosphatkörper bei 60 min Einwirkung doch abgebaut wurden, so beruhte das, wie Kontrollen zeigten, auf der unspezifischen Wirkung des leicht sauren Puffergemisches.

In Zellen, in denen nicht allzu viele Phosphatkörper lagen, bot der Kernapparat wiederum das Bild von parallel zur Fadenachse angeordneten Stäben (Abb. 12). Die gleiche Abbildung vermittelt jedoch noch einen weiteren Aufschluß. Die mit Pfeil gekennzeichnete Zelle enthält mindestens 6, höchstwahrscheinlich jedoch 8 offenbar gleich lange und nicht miteinander zusammenhängende stabförmige Elemente (Schema!). Von den sechs deutlich erkennbaren reichen drei an die

eine Querwand heran, die drei anderen an die gegenüberliegende. In der Mitte sind sie wie die Zähne zweier ineinandergeschobenen Kämme alternierend gelagert. Vergleicht man die Zellängen im ganzen Präparat, so erkennt man, daß eine gewisse Minimallänge nirgendwo unterschritten ist. Die gekennzeichnete Zelle aber ist gegenüber diesem Minimalmaß

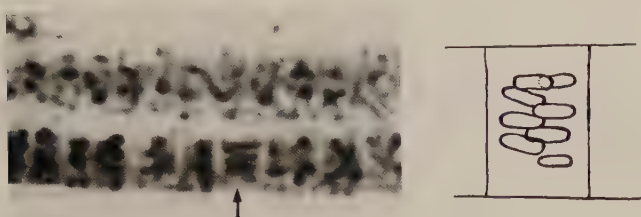


Abb. 12. *Oscillatoria amoena*, Ribonuclease — Giemsa, 2340:1

verhältnismäßig zu lang, d. h. sie befindet sich auf dem Wege zur Teilung. Gleichzeitig hat es den Anschein, daß die Länge der stabförmigen Chromatinelemente der minimalen Zelllänge etwa entspricht.

2. Ribonuclease — Pepsin — Giemsa (Verfahren Nr. 16)

PETERS u. WIGAND (1953), WIGAND u. PETERS (1954) haben ein Abbauverfahren ausgearbeitet, das es ermöglichen soll, den Gehalt von Bakterien, Rickettsien und größeren Viren an Nucleinsäuren qualitativ zu untersuchen. Ihm liegt folgende Überlegung zugrunde: Nach KAUFMANN, GAY u. MACDONALD (1951) finden wir in den Organismen im allgemeinen die Ribonucleinsäure an Protein zu Ribonucleoprotein gebunden. Die Ribonuclease eliminiert aber nicht den Proteinanteil, der mengenmäßig überwiegt und im Elektronenmikroskop den Hauptteil der Elektronenstreuung des Ribonucleoproteins verursacht. Wohl aber ermöglicht der Abbau mit Ribonuclease eine anschließende Beseitigung des Proteinanteils mit einer Protease, die vorher infolge seiner Blockierung durch die RNS nicht möglich war. Trypsin ist für diesen Zweck nicht brauchbar, da es selbst Nucleaseaktivität besitzt, wohl eignet sich Pepsin. Auch im Lichtmikroskop verhilft die Nachbehandlung mit Pepsin nach Angabe der Autoren zu klareren Bildern.

Diese Methode konnte jedoch nicht dazu beitragen, die Feinstruktur und den Teilungsmechanismus der Bakteriennucleoide im Lichtmikroskop aufzudecken, da das Auflösungsvermögen dieses Gerätes dabei überfordert wird. Bei den Cyano-

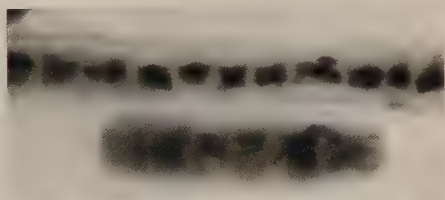


Abb. 13. *Oscillatoria amoena*, Ribonuclease — Pepsin — Giemsa, Einschuß in Pufferlösung, 2080:1

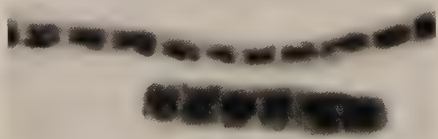


Abb. 14. Dieselben Fäden wie in Abb. 13, aber nach Entwässerung mit Aceton-Xylol und Einschuß in Caedax. Schrumpfung um 75 Volumprozent. 2080:1

phyceen liegen die hier wesentlichen Vorgänge aber offenbar bei den größeren Arten an der Auflösungsgrenze, so daß das Verfahren einen Vorteil zu bieten schien.

In der Tat klärte die Pepsineinwirkung das Bild erheblich. Außerdem hatte die Pepsinlösung allein durch ihre stark saure Reaktion ($p_H 2$) die wichtige Aufgabe, die Phosphatkörper nahezu völlig abzubauen. Die

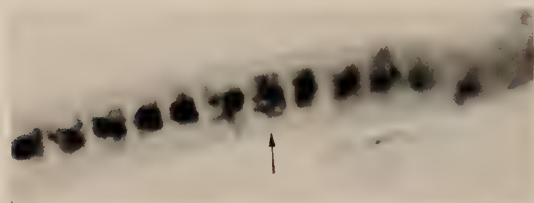


Abb. 15. *Oscillatoria amoena*, Ribonuclease — Pepsin — Giemsa, 2340:1

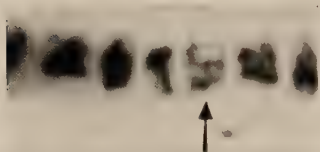


Abb. 16. *Oscillatoria amoena*, Ribonuclease — Pepsin — Giemsa, 2600:1

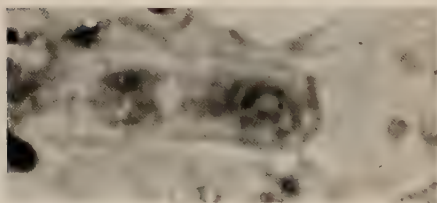


Abb. 17. *Oscillatoria amoena*, Nuclealreaktion, Einschluß in Caedax, 4200:1

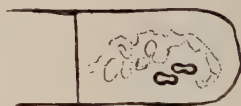


Abb. 13—16 verdeutlichen den Erfolg. Wiederum erkennt man Chromatinstäbe, die unter sich gleich lang und nicht länger als die kürzesten im Präparat erkennbaren Zellen sind, und die sich parallel zueinander in verschiedenen Richtungen zu verschieben scheinen, so daß beide bereits während des Längenwachstums der Zelle auf verschiedene Bereiche der Zelle und damit für später auf verschiedene Tochterzellen verteilt werden. Zur Ergänzung der Bilder sei noch das Photo eines FEULGEN-Präparates vorgelegt (Abb. 17), das bei charakteristischer artifizieller Hantelform der Chromatinelemente das gleiche Stadium erkennen läßt.

Nimmt man zu den vorstehenden Beobachtungen noch die Hypothese zu Hilfe, daß die Chromatinelemente durch Längsteilung auseinander hervorgehen, so ergibt sich das in Abb. 18 wiedergegebene Schema für

die Kernäquivalent- und Zellteilung (alle Elemente sind in die gleiche Ebene projiziert, ihre Zahl ist willkürlich gewählt).

Man muß dabei voraussetzen, daß die Chromatinverdopplung unmittelbar nach der Zellteilung stattfindet.

Hier muß nun auf eine morphologische Besonderheit der untersuchten Alge *Oscillatoria amoena* hingewiesen werden, die uns in cytologischer

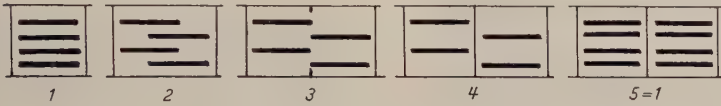


Abb. 18. Erklärung im Text

Hinsicht besonders interessant zu sein schien. Wenn *O. amoena* Hormogonien gebildet hat, so besitzen diese zunächst die einfachen durch mechanische Kräfte abgerundeten sog. „künstlichen“ Endzellen. Bei der Keimung der Hormogonien bilden sich dann die charakteristischen „natürlichen“ Trichomenden heraus, die einen verdünnten Halsabschnitt und eine köpfchenförmige Endzelle besitzen. Abb. 1 zeigt, daß die Bildung der „Hälsen“ und „Köpfchen“ unmittelbar nach der Lösung des Fadenzusammenhangs bzw. nach dem Zugrundegehen der Nachbarzelle einsetzt; denn zwei den Nekriden benachbarte Zellen besitzen



Abb. 19. *Oscillatoria amoena*, Ribonuclease — Pepsin — Giemsa, 2600:1

bereits einen kleineren Zelldurchmesser. Diese charakteristischen Bildungen lassen nun nach der Behandlung mit Ribonuclease-Pepsin-Giemsa einige bemerkenswerte Einzelheiten erkennen (Abb. 19—24). Die Abbildungen zeigen, daß in den Halszellen die Zahl der Chromatin-elemente offensichtlich reduziert ist, und zwar im allgemeinen bis zur Zahl zwei. In günstigen Fällen (Abb. 19, 20, 23 jeweils die erste Halszelle) kann man erkennen, daß sich diese letzten beiden Elemente noch gegeneinander verschieben und damit wohl auch bei einer Zellteilung trennen können. Es würden demnach die für das Leben einer Zelle notwendigen Desoxyribonucleoproteide bereits in einem einzigen derartigen Element weitergegeben werden können.

Daß diese letzte Erscheinung nur in wenigen Fällen hinreichend deutlich erkennbar ist, liegt wohl daran, daß das einzelne Element sich nach

der Zellteilung sehr rasch wieder verdoppelt und schon in den proximal unmittelbar anschließenden Zellen statt des Zwei-Eins-Rhythmus der Vier-Zwei-Rhythmus einsetzt, wie ihn die Abb. 19, 20 und 24a, b (zweite Halszelle), 21 und 22 (erste und zweite Halszelle) zeigen. Die dritte Halszelle von Abb. 24a, b zeigt bereits einen Sechs-Drei-Wechsel. In den Fadenstücken mit normaler Dicke scheint ein Acht-Vier-Wechsel stattzufinden.

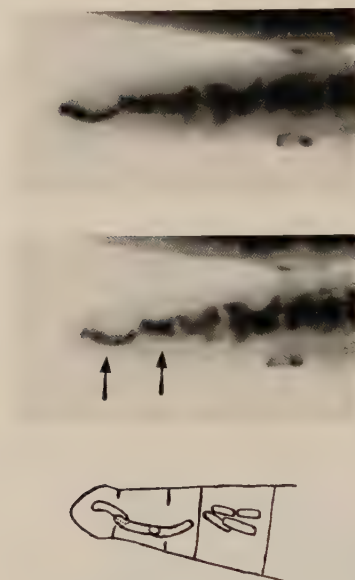


Abb. 20a und 20b. *Oscillatoria amoena*, Ribonuclease — Pepsin — Giemsa, zwei Einstellebenen. 2600:1

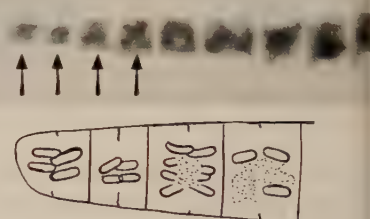


Abb. 21. *Oscillatoria amoena*, Ribonuclease — Pepsin — Giemsa, 2600:1

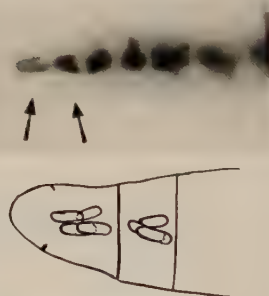


Abb. 22. *Oscillatoria amoena*, Ribonuclease — Pepsin — Giemsa, 2600:1

Nach Abb. 24a, b ist wohl die Verdoppelung der Elemente nicht so genau synchronisiert, daß stets ganze Potenzen von zwei als Anzahl auftreten. Eine solche Synchronisation wäre nach der obigen Deutung auch nicht unbedingt erforderlich. Die Köpfchenzelle scheint nur über ein einziges Chromatinelement zu verfügen, das aber bisweilen schlecht erkennbar ist. Anscheinend teilt sich diese Zelle nicht mehr, sobald sie vollständig ausgebildet ist und sich distal mit einer verdickten Membran (Kalyptra) umgeben hat.

In den vorliegenden Präparaten wurden die Durchmesser von 10 „ersten Halszellen“ sowie die Durchmesser der gleichen Fäden im angrenzenden ausgewachsenen Teil bestimmt. Es ergab sich ein Wert von $2,0 \pm 0,2 \mu$ für die Halszellen und von $4,0 \pm 0,4 \mu$ für die ausgewachsenen Zellen. Demnach besitzen die normalen Zellen einen etwa viermal größeren Querschnitt als die „ersten Halszellen“. Bei der Annahme einer Beziehung zwischen Anzahl der Chromatinelemente und Zellgröße

(„Kern-Plasma-Relation“: DNS-Plasma-Relation) würden demnach den 2 oder 1 Chromatinelementen der Halszellen deren 8 oder 4 in den ausgewachsenen Zellen entsprechen, was mit der jeweils tatsächlich beobachteten Anzahl übereinzustimmen scheint.

Zum Vergleich wurden in diese Versuchsreihe eine Chroococcale (*Gloeotheca* spec.) und eine Nostocacee (*Nostoc* spec.) einbezogen. Bei *Gloeotheca* verhinderte die allseitig abgerundete Form der Zellen und die

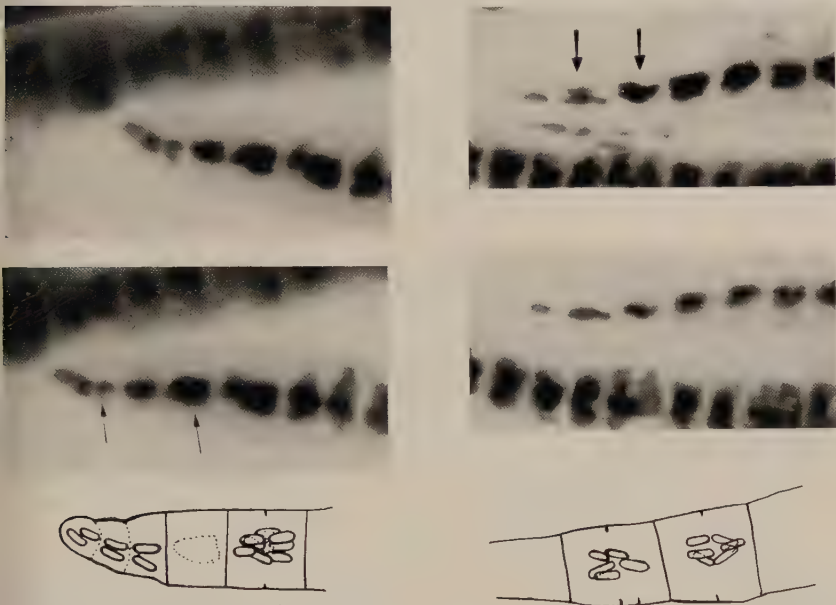


Abb. 23 a und 23 b. *Oscillatoria amoena*,
Ribonuclease — Pepsin — Giemsa, zwei
Einstellebenen, 3900:1

Abb. 24 a und 24 b. Ebenso

Schleimhülle eine genauere Beurteilung der Verhältnisse im Wasserpräparat, es wurde daher nach Verfahren 16 b entwässert.

Gloeotheca spec. besitzt wie *Oscillatoria amoena* fadenförmige Chromatinelemente von gleicher Länge (Abb. 25—30). Die Fäden sind hier länger als der Durchmesser der Zelle und liegen daher gekrümmt. Sie kommen durchweg in Zweizahl vor. Auffallenderweise liegen diese Fäden in vielen Zellen abschnittsweise oder völlig parallel. Darüber hinaus lassen sich Einzelheiten einer Längsteilung studieren. Es lassen sich nämlich Stadien erkennen, in denen beide Fäden sich in der Mitte bereits getrennt haben und an den Enden noch zusammenhängen (Abb. 29), so daß sie an Anaphasechromosomen erinnern. In anderen Fällen aber liegen die Fäden getrennt, die Mittelstücke jedoch so nahe beieinander, daß Zweifel auftreten können, ob die Fäden hier noch zusammenhängen oder zufällig

verschlungen oder sekundär aneinandergeraten sind (Abb. 28). Die Längsteilung der Elemente scheint uns ausreichend belegt, über Einzelheiten dieser Längsteilung sind jedoch noch keine sicheren Aussagen möglich.



Abb. 25. *Gloeotheca* spec.,
Ribonuclease — Pepsin — Giemsa, 2600:1



Abb. 26. *Gloeotheca* spec.,
Ribonuclease — Pepsin — Giemsa, 2600:1

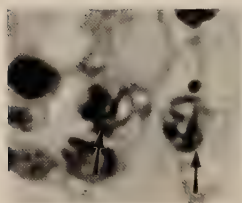


Abb. 27. *Gloeotheca* spec.,
Ribonuclease — Pepsin — Giemsa. Reste
unvollständig hydrolysierter Polyphosphatkörper, 2600:1

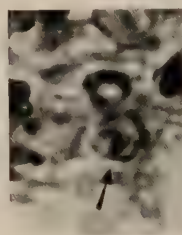


Abb. 28. *Gloeotheca* spec.,
Ribonuclease — Pepsin — Giemsa.
Mit 2 Deutungen, 2600:1

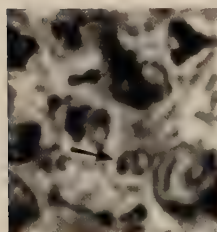


Abb. 29. *Gloeotheca* spec.,
Ribonuclease — Pepsin — Giemsa, 2600:1

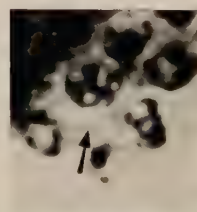


Abb. 30. *Gloeotheca* spec.,
Ribonuclease — Pepsin — Giemsa, 2600:1

Nostoc spec. zeigte im Gegensatz zu *Gloeotheca* spec. sehr kurze Chromatinelemente in größerer Zahl (6 bzw. 3 oder auch 8 bzw. 4), die wiederum deutlich in Fadenlängsrichtung angeordnet waren. Sie waren nur etwa halb so lang wie die Zellen und lagen häufig paarig nebeneinander. Für eine genauere Analyse und gute photographische Wiedergabe war diese Form jedoch weniger gut geeignet.

3. *Desoxyribonuclease* (Verfahren Nr. 17 und 18)

Desoxyribonuclease wurde in gereinigter, kristallisierter Form von KUNITZ (1950) isoliert und angewendet. In den eigenen Versuchen wurde das Ferment jedoch in Anlehnung an PETERS u. WIGAND (1953) eingesetzt. Die Einwirkungsdauer mußte aber erhöht werden, dabei wurde die Fermentlösung nach dem Vorschlag von JACKSON u. DESSAU (1955) mehrmals gewechselt.

Nach der Behandlung mit *Desoxyribonuclease-Giemsa* war die *Basophilie* des Chromatinapparates aufgehoben, das Plasma erschien dagegen weiterhin blau gefärbt; die Phosphatkörper behielten ihre Färbbarkeit.



Abb. 31. *Oscillatoria amoena*, *Desoxyribonuclease* — *Ribonuclease* — *Giemsa*, Polyphosphatkörper. 2340:1



Abb. 32. *Oscillatoria amoena*, *Ribonuclease* — *Giemsa*, Chromatinapparat und Phosphatkörper (Kontrolle zu Abb. 30). 2340:1

Nach *Desoxyribonuclease-Ribonuclease-Giemsa* erschien die Zelle bis auf die Phosphatkörper ungefärbt (Abb. 31), während die nur mit *Ribonuclease* behandelten Kontrollen deutlich die Kernäquivalente inmitten der Phosphatkörper zeigten (Abb. 32). Diese Versuche bestätigten also die mit der Nuclealreaktion und dem *Ribonuclease*verfahren gewonnenen Ergebnisse in cytochemischer Hinsicht.

Gallocyanin-Indiumalaun als Farbstoff für das Licht- und Elektronenmikroskop (Verfahren Nr. 19—22)

Die Affinität von *Gallocyanin-Chromalaun* zu Nucleinsäuren ist bekannt. SANDRITTER, DIEFENBACH u. KRANTZ (1954) wiesen eine quantitative Bindung nach. Die Spezifität dieser Reaktion wird von STENRAM (1953) und anderen jedoch teils allgemein, teils für bestimmte pH-Bereiche angezweifelt. BAHR (1953) ersetzte das Chrom durch Indium und führte damit ein Element ein, das auf Grund seines hohen Atomgewichtes und damit seines beachtlichen Elektronenstreuungsvermögens die Verteilung des Farblackes auch im Elektronenmikroskop erkennbar macht. Gleichzeitig färbt der Indiumlack auch, für lichtmikroskopische Zwecke verwendet, intensiver als der Chromlack.

Um Einwänden hinsichtlich der Spezifität zu entgehen, wurde unser Material mit *Ribonuclease* vorbehandelt.

Das Ergebnis für das Lichtmikroskop zeigt Abb. 33. Man erkennt Chromatinapparate mit schlechter Strukturerhaltung, die auf den vielstündigen Aufenthalt in der erwärmten wäßrigen Farblösung zurückzuführen ist.

Die Vorbehandlung der Algen für das Elektronenmikroskop war schwieriger. Sie hatte zunächst eine Beseitigung des stark streuenden, im Plasma fein verteilten stärkeähnlichen Assimilationsproduktes

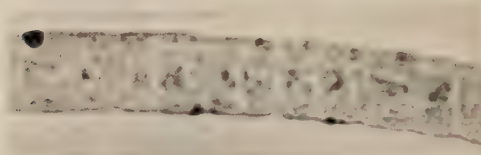


Abb. 33. *Oscillatoria amoena*,
Ribonuclease — Galloeyanin-Indiumalaun, 2080:1

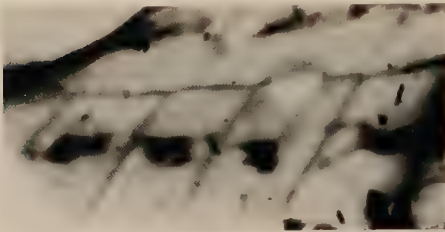


Abb. 34. *Oscillatoria amoena*,
Amylase — Ribonuclease — Pepsin — Galloeyanin-
Indiumalaun. Elektronenmikroskopische Aufnahme, 4800:1

mit Amylase anzustreben (BRINGMANN 1950, METZNER 1955). Anschließend mußte die Ribonucleinsäure mit Ribonuclease und ihr Protein mit Pepsin beseitigt werden. Zum Schluß wurde die übriggebliebene DNS durch den Farbstoff hervorgehoben. Nach diesem Verfahren ließen sich die Kernäquivalente der Cyanophyceen erstmalig im Elektronenmikroskop sichtbar machen (Abb. 34), während die Behandlung mit Fermenten allein keine eindeutigen Bilder ergab.

Da mit der verstärkten Diastaseeinwirkung eine mehr oder weniger starke Autolyse einherging, war die Strukturerhaltung schlecht. Die hellen Räume in Abb. 34 rühren von Phosphatkörpern her, die infolge der notwendigen hohen Bestrahlungsintensität verdampft sind.

Diskussion

In den einleitenden Untersuchungen über Gestalt und Verhalten der kernäquivalenten Strukturen bei *Oscillatoria amoena* und einigen weiteren fadenförmigen Cyanophyceen wurden im wesentlichen die Auffassungen von GUILLIERMOND (1906, 1926, 1933), HAUPT (1923), POLJANSKY u. PETRUSCHEWSKY (1929), GEITLER (1936), SPEARING (1937) sowie CASSEL u. HUTCHINSON (1954) bestätigt. Im Gegensatz zu BRINGMANN (1950), HERBST (1953, 1954) und VON ZASTROW (1953) stellt der Chromatinapparat ein aus linearen Strukturen aufgebautes, frei im Plasma liegendes feulgenpositives Gebilde dar.

Die Ursache, die zu diesen divergierenden Auffassungen führte, liegt in methodischen Schwierigkeiten. Die „Volutin-“ oder „Metachromatinkörner“, die nach WIAME (1946, 1947), EBEL (1952) und EBEL u. COLAS

1954) als charakteristischen Bestandteil Polymetaphosphatanionen hohen Polymerisationsgrades enthalten, können infolge ihrer hohen Basophilie ganz ähnliche cytochemische Reaktionen geben wie die Nucleinsäuren. So vermag z. B. die Färbung mit Methylgrün oder Pyronin nichts über den Nucleinsäuregehalt der Grana auszusagen; denn die Polyphosphate geben mit diesen Farbstoffen eine stärkere Färbung als die Nucleinsäuren selbst. Die hinreichend bekannte Inkonzistenz der Grana bei verändertem physiologischem Zustand spricht zudem gegen einen Zusammenhang mit kernähnlichen Strukturen (so auch HARTMANN 1953). Auch die Rötung der Grana mit fuchsin-schwefliger Säure ist auf die Polyphosphate zurückzuführen und kein Hinweis auf „locker gebundene Nucleinsäuren“, wie außer BRINGMANN auch in früheren Jahren REICHENOW (1928: „freie Thymonucleinsäure“) glaubte annehmen zu dürfen.

Ferner glauben wir, daß es nicht möglich ist, mit Fluorochromierungsversuchen allein (VON ZASTROW 1953, KRIEG 1954) zu einer endgültigen Entscheidung zu kommen oder diese Verfahren zur Grundlage einer Definition von Zeileinschlüssen zu verwenden.

Gegen die Anwendung der salzsauren Hydrolyse, wie sie zur Nuclealreaktion und zur HCl-Giemsa-Färbung herangezogen wird, ergaben sich im weiteren ebenfalls gewisse Bedenken.

Die weitergehenden Beobachtungen mit verbesserten Methoden an *Oscillatoria amoena*, *Gloeothece spec.* und *Nostoc spec.*, die wir beschrieben haben, erlauben jedoch gewisse Rückschlüsse auf chemische Zusammensetzung, Gestalt und Verhalten sowie die Funktion der als Chromatinapparat bezeichneten Strukturen.

Da die Chromatinstrukturen ihre Färbbarkeit mit basischen Farbstoffen nach Behandlung mit Desoxyribonuclease, nicht aber nach Ribonucleaseeinwirkung verlieren und mit den diese Reaktionen störenden Polyphosphatkörpern nicht, wohl aber mit den feulgenpositiven Strukturen identisch sind, enthalten sie Desoxyribonucleoproteide, und zwar als einzige Einschlüsse der Cyanophyceenzelle.

Unter der Annahme, daß die Zellkernfunktion bei anderen Organismen allgemein an DNS-haltige Strukturen gebunden ist, muß bei der Diskussion ihrer Gestalt und ihres Verhaltens bei den Cyanophyceen berücksichtigt werden, inwieweit sich diese Merkmale mit unseren grundlegenden Vorstellungen von Gestalt und Verhalten von Zellkern-Elementar-einheiten vereinbaren lassen.

Die beobachteten Strukturen besitzen Stab- oder Fadenform. Ihr Durchmesser beträgt bei den untersuchten Arten etwa $0,2 \mu$, ihre Länge ist in den untersuchten Fällen artkonstant. Diese lineare Gestalt legt neben der äußeren eine innere strukturelle Ähnlichkeit mit den DNS-haltigen Körpern höherer Organismen nahe.

Das Verhalten der Chromatinelemente ist im wesentlichen dadurch gekennzeichnet, daß sie sich längs spalten und anschließend in irgendeiner Weise auseinanderweichen. Die Längsspaltung wurde vor allem bei *Gloeothece* spec. deutlich, während sie bei den beiden anderen Arten aus der häufig zu beobachtenden Parallellagerung zu erschließen ist. Bei *Gloeothece* erhält bereits ein einziges Element die Zelle lebensfähig, bei *Oscillatoria amoena* ebenfalls, obwohl in ausgewachsenen Zellen stets mehrere vorhanden sind, aber diese sind offenbar aus einem einzigen durch Vervielfachung hervorgegangen und daher untereinander gleichwertig.

Es wurde keine achromatische Struktur nach Art einer Teilungsspindel gefunden und ebenfalls keine Anordnung der Chromatinelemente, die die Existenz einer solchen vermuten läßt. Da derartige Gebilde und Anordnungen bisher bei den Cyanophyceen auch von anderen Autoren nicht überzeugend nachgewiesen wurden und die meisten Untersucher sich gegen ihre Existenz verwahren, dürfte dem hier beschriebenen Mechanismus im Reich der Cyanophyceen allgemeinere Bedeutung zukommen. In diesem Zusammenhang verdient erwähnt zu werden, daß nach JAKOB (1950) und HERBST (1952) die Entwicklung von Cyanophyceen auch in Gegenwart von Colchicin ungehindert möglich ist.

Ribonucleinsäure befindet sich bei den untersuchten Arten mit Sicherheit im Plasma diffus verteilt (Bestätigung der Befunde von NEUGNOT 1951). Nucleolen oder ähnliche Gebilde (SPEARING 1937) wurden nicht beobachtet. Nach diesen Ergebnissen ähnelt die Ribonucleinsäureverteilung in der Zelle der bei Bakterien. Soweit aus den subjektiv beurteilten Färbintensitäten bei verschiedenen altem Material geschlossen werden kann, sind auch bei den Cyanophyceen junge Zellen reich an RNS, was mit den UV-mikroskopischen Befunden von PRAT (1925) und FOGG (1951) übereinstimmt.

Inwieweit unsere „Chromatinelemente“ mit den „Chromosomen“ der alten Autoren identisch sind, bleibe dahingestellt. Nur HEGLERS Arbeit (1901) sei erwähnt, da sie mit Photographien ausgestattet ist. HEGLER glaubte an eine echte Mitose bei den Cyanophyceen, bedauerte nur, keine Äquatorialplatten gefunden zu haben. Nach einer Abbildung und der Beschreibung im Text enthielt eine Nostocacee „besonders kurze Chromosomen“, er beobachtete also Einzelelemente von etwa gleicher Länge. Die Abbildungen von HAUPT (1923), die in der Folgezeit in Zusammenfassungen häufig wiedergegeben wurden, entstammen Schnittpräparaten, enthalten also „Granula“, die in Wirklichkeit quergeschnittene Stäbe darstellen. Aus GUILLIERMOND (1926) können die Abb. 6 und 7 als Beleg dafür angegeben werden, daß die hier wiedergegebenen Auffassungen mit den Beobachtungen GUILLIERMONDS grundsätzlich vereinbar sind.

Besonders beachtenswert ist die Arbeit von SPEARING (1937), der bereits aus den V-Formen der Chromatinelemente eine Längsteilung ableiten zu können glaubte. In *Oscillatoria spec.* fand er einzelne Stäbe, deren Anzahl in verschiedenen Zellen nicht völlig konstant war (5 bis 7 Stück). Er nahm hier aber eine Querteilung der Stäbe im Verlaufe der Zellteilung an. NEUGNOT (1951) beschreibt an ihren HCl-Giemsa-Präparaten, die am besten erhalten sind (vielleicht sind dies auch die Ribonucleasepräparationen, die sie erwähnt), sich querteilende Fäden, die

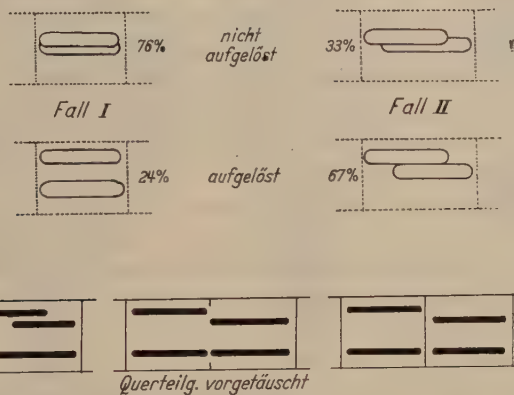


Abb. 35. Erklärung im Text

sie dann nichtsdestoweniger als „des chromosomes typiques“ bezeichnet. KRIEG (1954) vermerkt auf Grund von Fluoreszenzbildern stabförmige Elemente in Hormogonalen und nimmt offenbar je nach den in den Zellen vorhandenen Raumverhältnissen (!) deren Quer- oder Längsteilung an.

Daß diese Widersprüche in der Literatur in gewisser Weise verständlich sind, zeigt die folgende Überlegung: Der Durchmesser der Chromatinelemente beträgt etwa $0,2 \mu$, das Auflösungsvermögen des Mikroskops liege bei dem gleichen Wert. Wir nehmen nun an, daß sich ein solches Chromatinelement längsgespalten hat und seine Teilstücke sich mit gleichförmiger Geschwindigkeit bis zu einem (tatsächlich beobachteten) maximalen Abstand von $0,4 \mu$ voneinander entfernen. Wenn sich die Elemente bei dieser Bewegung nicht gleichzeitig in Richtung ihrer Längsachse auseinanderschieben, sondern auf gleicher Höhe liegen bleiben (Fall I in Abb. 35), so sind sie erst dann als getrennt erkennbar, wenn zwischen ihnen ein freier Raum von $0,2 \mu$ liegt. Die Berechnung ergibt, daß dies in 24% aller Fälle eintreten wird, während in 76% aller Fälle die Elemente nicht als getrennt wahrgenommen werden können. Haben sich beide Tochterelemente dagegen bereits in ihrer Längsrichtung gegeneinander verschoben (Fall II), so braucht zwischen ihren senkrechten Projektionen kein Zwischenraum mehr zu liegen, damit sie als getrennt erkennbar sind. Hier können 67% der Fälle richtig beurteilt werden, während in den übrigen Fällen eine Verlängerung des ursprünglichen Elements und eine anschließende Querteilung vorgetäuscht wird.

Wegen der Vielzahl der Elemente in jeder Zelle wird die Zahl der gut deutbaren Bilder noch weit geringer. Algen mit einem kleineren Zelldurchmesser als die vorliegenden (um $4\ \mu$) dürften für eine solche Untersuchung kaum noch in Frage kommen und größere nur, wenn eine Schrumpfung der Zellen peinlich vermieden wird. Beim Vergleich der Abb. 13 und 14 erkennt man, wie eine Behandlung von *O. amoena* mit Aceton-Xylol und Einschluß in Caedax die Zellen um rund 50% gegenüber dem in Wasser eingeschlossenen Präparat und damit fast bis zur Unkenntlichkeit schrumpfen läßt.

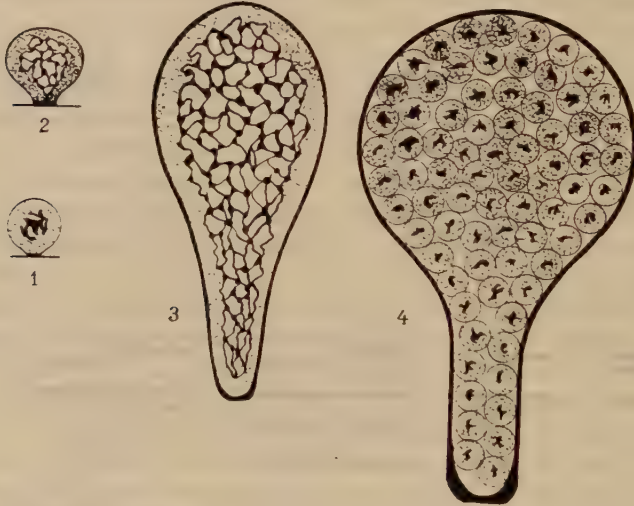


Abb. 36. Entwicklung von *Dermocarpa fucicola* (aus GARDNER 1906)

GUILLIERMOND (1906, 1926) beschreibt, daß sich der Chromatinapparat in physiologisch alten Zellen in fädige Stücke auflöst, die sich in der Zelle verteilen. Das bedeutet nach unserer Auffassung lediglich, daß die bereits vorhandenen einzelnen Chromatinelemente sich mit abnehmender Teilungsfrequenz und einsetzender Vacuolisierung der Zelle regellos zerstreuen.

Vor allem aber sei auf die Bildung der Endosporen bei der chamaesiphonalen Cyanophyce *Dermocarpa fucicola* (Abb. 36) hingewiesen, die GARDNER (1906) beschrieben hat. Danach wandelt sich der ganze Inhalt der reifen Zelle in Endosporen um. Der „Kern“ (nach GARDNER ein Netzwerk) zerbricht angeblich in einzelne, gleich große, fädige Teilstücke, von denen sich jedes mit einer Plasmaportion und einer Sporenmembran umgibt. Wir finden hier eine unmittelbare Parallele zur Schwärmerbildung bei dem Radiolar *Aulacantha scolymantha* (GRELL 1952), bei der die Sammelchromosomen die Stelle der „Chromatinstücke“ einnehmen.

Der Vergleich mit den Sammelchromosomen GRELLS führt schließlich zu der Frage, wie die feulgenpositiven Elemente der Cyanophyceen zu

deuten sind. Nach den bisherigen Darlegungen dürfte das „Chromatinelement“ der Cyanophyceen funktionell einem Chromosom entsprechen. Wir verstehen unter einem Chromosom einen linear gebauten, reduplikationsfähigen Träger DNS-gebundener Erbfaktoren, der eine bestimmte Feinstruktur besitzt. Es sind je nach der Art des untersuchten Materials und der Auflösungsfähigkeit des Mikroskops Chromatiden, Halb- und Viertelchromatiden zu erkennen, ein Strukturprinzip, das bis zu den Desoxyribonucleoproteidmolekülen als letzten Längseinheiten des Chromosoms (MARQUARDT 1953, PFEIFFER 1951) fortgesetzt gedacht werden kann. Wenn erhöhte oder verminderte Polytänie (Speicheldrüsen-, „chromosomen“) und Fehlen eines Spindelansatzpunktes (holokinetische Chromosomen, Sammel-, „chromosomen“) den Begriff des Chromosoms in Anbetracht der wesentlichen Gemeinsamkeiten aller dieser Gebilde nicht sprengt, so wird man diesen Namen den Chromatinelementen der Cyanophyceen nicht vorenthalten können. Es sind Strukturen, die den Chromosomen der höheren Organismen analog, wenn nicht gar homolog sind. Den Sammelchromosomen scheinen sie nur der Funktion, nicht aber der Struktur nach zu gleichen; denn Sammelchromosomen können wieder in einzelne und untereinander nicht homologe Chromosomen zerfallen.

Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß in den vorliegenden Versuchen nur sehr lebhaft wachsende Fäden beobachtet wurden. Daß bei langsamerer Teilungsfolge gewisse Ruhestadien, Verknäuelungen, Streckungen und Verkürzungen, vielleicht sogar Zerfallserscheinungen nach Art des Sammelchromosomenzerfalls auftreten können, ist nicht ausgeschlossen. Manche Darstellungen in der Literatur lassen derartige Vorgänge vermuten.

Unsere Auffassung, daß jede normale Oscillatorienzelle in jedem ihrer Chromosomen ein vollständiges Genom zur Verfügung hat (also polyploid ist), stimmt mit der ganz außerordentlich hohen Resistenz dieser Formen gegen Röntgenstrahlen (HERBST 1952) überein. Gleichzeitig hätten wir zu erwarten, daß die Halszellen von *Oscillatoria amoena* Orte erhöhter Empfindlichkeit darstellen.

Die Cyanophyceen besitzen also offenbar Chromosomen, besitzen sie aber auch einen Nucleus?

Die Cyanophyceen werden wie die Bakterien vielfach noch heute den übrigen Organismen als „zellkernlos“ gegenübergestellt, eine Auffassung, der von einer Reihe von Autoren seit Jahren mit Recht entgegengehalten wird, daß sie den wesentlicheren Teil vom Inhalt des Kernbegriffes zugunsten weniger wichtiger Einzelheiten vernachlässigt. PIEKARSKI prägte 1937 für die Bakterien den Begriff des Nucleoids. Das Nucleoid ist ein Gebilde, das sich chemisch und physiologisch wie ein Zellkern verhält, wobei über seine Feinstruktur jedoch noch nichts ausgesagt werden soll.

PIEKARSKI präzierte 1950 seine Ansichten: Er forderte einen Kernbegriff, der die Funktion dieses Gebildes, seine Natur als nur aus seinesgleichen durch Teilung hervorgehendes, unentbehrliches Zellorgan und seinen DNS-Gehalt in den Vordergrund stellt. Er forderte einen Kernbegriff, der den alten Kernbegriff und das Nucleoid umfaßt, ohne dabei für das Nucleoid die Forderung nach identisch sich reduplizierenden Innenstrukturen aufzugeben. In der angloamerikanischen Literatur löste man sich aber auch von dieser Forderung und bezeichnete die Bakterien-nucleoide bald kurzerhand als „nuclei“. Als ein extremer Verfechter dieser Richtung kann KNAYSI (1955) gelten, wenn er schreibt: „We, on the other hand, prefer to apply the term nucleus to any chromatin containing organized body that grows, multiplies, actively participates in the development of the organism throughout all phases of its life history, and seems to lead an independent existence within the cytoplasm“, aber in seinen Arbeiten die Forderung nach kernähnlicher „Organisation“ der Nucleoide praktisch aufgibt.

Für die Cyanophyceen stellt sich das Problem nun von einer anderen Seite. Die Existenz von identisch sich reduplizierenden DNS-haltigen Feinstrukturen kann als erwiesen gelten, auch die Forderung nach spezifischer physiologischer Bedeutung dieser Strukturen scheint erfüllt zu sein; was jedoch fehlt, ist die morphologische Einheit und Abgeschlossenheit, die sich mit dem Begriff „Kern“ von vornherein verbindet. Bei den Cyanophyceen liegt allem Anschein nach jedes Element — vielleicht für sich mit einer Membran umgeben — einzeln im Plasma, es ist offenbar Träger eines vollständigen Genoms. Allein mit Rücksicht auf diesen Umstand wurde die Gesamtheit der als Chromosomen gedeuteten Strukturen vorläufig als „Chromatinapparat“, nicht als Kern bezeichnet.

Da in den Halszellen von *O. amoena* offenbar Teilungen ablaufen, müssen sich Zellen mit nur einem einzigen Chromosom zu solchen mit einer höheren Anzahl entwickeln, wenn die Gestalt des Trichomendes erhalten bleiben soll. Wenn jedoch die Zahl von etwa 8 erreicht ist, kommt dieser Prozeß aus uns bisher unbekannten Ursachen zum Stillstand. Parallel mit der Vermehrung der chromosomalen Elemente je Zelle erkennen wir, daß der Trichomdurchmesser zunimmt. Nach JAAG (1941) aber ist der Trichomdurchmesser einer Oscillatoriacee ein besonders umweltstabiles Merkmal. Solange wir nicht in der Lage sind, Ursachen und Wirkungen in diesen Zusammenhängen zu erkennen, ist es nicht möglich, von der Existenz eines einheitlichen Steuerungszentrums in der Zelle nach Art eines Zellkerns zu sprechen oder gar dieses in einem einzigen chromosomalen Element oder ihrer Gesamtheit lokalisiert zu denken. Ebenso wenig aber können wir vorerst GEITLER (1942) beipflichten, der es für erwiesen hält, daß gewisse Kernfunktionen bei den Cyanophyceen im Plasma lokalisiert sind, oder SCHUSSNIG (1953), der

glaubt, daß der Cyanophyceenprotoplast („Archiblast“) „noch“ nicht in einen Kern und ein Cytoplasma unterteilt sei.

Die älteren Autoren, die den Chromatinapparat im ganzen für einen Zellkern halten, diskutieren auch des öfteren sein Verhalten bei der Teilung, die sie als amitotisch bezeichnen; denn zum Begriff der Mitose gehörte noch bis vor einiger Zeit neben dem Auftreten von Chromosomen auch die Beteiligung gewisser achromatischen Strukturen, die bei der Kernteilung die Zuteilung ganzer Genome zu den Tochterkernen allein garantieren sollten. GRELL versuchte noch 1950, die ohne Spindelbildung ablaufende, aber dennoch biologisch vollwertige Teilung von Suktorienmakronuclei als Amitose zu bezeichnen. Es hat sich jedoch als auf die Dauer zweckmäßiger erwiesen, jede Kernteilung, welche die Aufteilung voller Genome garantiert, zur großen und mannigfaltigen Gruppe der Mitosen zu rechnen (HUSKINS 1952, HARTMANN 1953). Die Amitose wird jetzt der Kernfragmentation (z.B. in alternden Säugergeweben, bei *Chara*) praktisch gleichgesetzt, also einem Vorgang, der nicht zur Bildung von vollwertigen Kernen, sondern von Kerntrümmern führt und im allgemeinen auch nicht von einer Zellteilung gefolgt wird, sondern eine degenerative Erscheinung darstellt. In diesem Sinne also besitzt die Teilung des Chromatinapparates der Blaualgen durchaus mitotischen Charakter; der Chromatinapparat tritt in ihr als eine physiologische Einheit in Erscheinung.

Vergleicht man die Teilung des Chromatinapparates mit den Kernteilungen mancher Protozoen, so zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung, ein Umstand, auf den besonders DEHORNE (1920), GUILLIERMOND (1933) und GUILLIERMOND, MANGENOT u. PLANTEFOL (1933) hingewiesen haben. Die Chromosomen mancher Formen gruppieren sich in ganz ähnlicher Weise [Amöben: VAHLKAMPF 1905; Euglenen: DEHORNE 1920, TSCHENZOFF 1916; Dinoflagellaten (*Ceratium*) BORGERT 1910, ENTZ 1921, parasitische Peridineen: CHATTON 1918, CHATTON u. POISSON 1930]. Diese Bilder werden bei diesen Organismen wie bei den Cyanophyceen als eine Querteilung achromatischer Strukturen („Haplomitose“) beschrieben, aber nach und nach als äußerlich modifizierte Mitosen aufgeklärt (z. B. SKOCZYLAS 1954). Achromatische Strukturen sind bei den genannten Protozoen, wenn beobachtet, dann offenbar nur in geringerem Maße als gewöhnlich an der Kernteilung beteiligt. Es kann nicht Aufgabe dieser Arbeit sein, erscheint aber nicht mehr unmöglich, eine fortschreitende Folge von Mitosetypen herauszustellen, die sich gleichen im Prinzip der Zuteilung voller Genome, sich aber unterscheiden im Grad des Eingreifens achromatischer Strukturen in gewisse Abschnitte der Anaphasebewegung. Die Teilung des Chromatinapparates in den hier untersuchten Cyanophyceen würde dann als ein extremer Typ dieser Reihe aufzufassen sein.

Wollen wir schließlich den Versuch unternehmen, die Entstehung der sog. Halszellen aus den „normalen“ Zellen eines Fadens zu erklären, so ergeben sich wohl folgende Überlegungen: Wir beobachten, daß bei der Bildung des charakteristischen Trichomendes die Anzahl der chromosomenartigen Elemente in einigen endständigen Zellen verringert wird. Außerdem haben wir bereits darauf hingewiesen, daß in den fertig ausgebildeten Trichomenden die Köpfchenzellen keine Teilungsstadien mehr

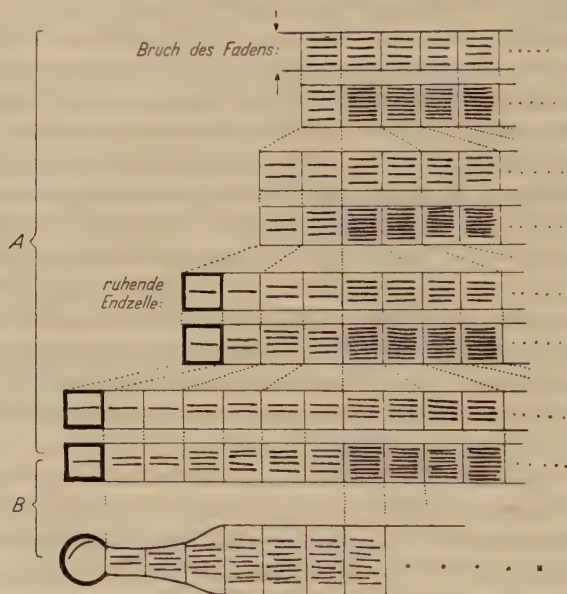


Abb. 37. Erklärung im Text

zeigen, wohl aber noch die Halszellen, vor allem die zweite und dritte, wobei über die Teilungsfrequenz allerdings nichts ausgesagt werden kann.

Diese Verhältnisse kann man sich mit Hilfe von zwei Annahmen erklären, die freilich vorläufig nur rein hypothetischen Wert besitzen: 1. Die Zelle am Ende eines Fadens verliert die Fähigkeit, ihr Chromatin zu verdoppeln, die Zellteilungen werden jedoch nicht eingeschränkt, solange noch mehr als ein Chromosom vorhanden ist. Besitzt die Zelle jedoch nur noch ein einziges Chromosom, kommt sie zur Ruhe. Diese Annahme würde die Entstehung eines Trichomendes mit an Chromosomen verarmten Zellen erklären (Abb. 37, Abschnitt A). Dieses Ende würde aber immer länger, wenn nicht 2. die Halszellen die Fähigkeit besäßen, durch überschüssige Chromatinverdopplungen ihren Gehalt an Chromosomen zur irgendwie erblich bedingten Höchstzahl „aufzuregulieren“, so daß durch das Zusammenspiel beider Faktoren die Halszone kurz bleibt (Abb. 37, Abschnitt B). In der Schemazeichnung ist die Wirkung beider hypothetischen Faktoren bei angenommener gleicher Teilungsfrequenz aller Zellen getrennt dargestellt.

Zum Schluß sei noch einmal darauf hingewiesen, daß bei cytomorphologisch wie cytochemisch so wenig bekannten und schwierigen Objekten

den Cyanophyceen nur dann unsere Kenntnisse zuverlässig erweitert werden können, wenn mit mehreren zuverlässigen und sich gegenseitig stützenden und ergänzenden cytochemischen Verfahren verglichen und gearbeitet wird, wie in unserem Falle mit Ribo- und Desoxyribonuclease und älteren Methoden. Werden als spezifisch geltende Arbeitsweisen auf neue Organismen angewendet, besteht die Gefahr der Täuschung durch Zelleinschlüsse mit unzureichend bekanntem cytochemischem Verhalten, wie es in unserem Falle die Polyphosphatkörper bis in die letzten Jahre waren und auch heute noch zum Teil sind.

Zusammenfassung

1. Die drei untersuchten Cyanophyceenarten (*Oscillatoria amoena* Lütz.) Gom., *Gloeothece* spec. und *Nostoc* spec.) enthalten in ihren Zellen Desoxyribonucleinsäure, die in einem oder mehreren gleichgestalteten und gleichwertigen stab- oder fadenförmigen Elementen lokalisiert ist.
2. Diese Elemente teilen sich offenbar längs und werden ohne Ausbuchtung achromatischer Strukturen in gleicher oder annähernd gleicher Anzahl auf die Tochterzellen verteilt.
3. Jedes dieser Elemente enthält offenbar ein vollständiges Genom.
4. Diese Elemente lassen sich mit Chromosomen gleichsetzen, ihre Gesamtheit (physiologische Einheit), die wir als Chromatinapparat bezeichnen, stellt das Kernäquivalent der Cyanophyceen dar.
5. Allem Anschein nach fehlen Kernmembran und Nucleolen.
6. Sogenannte spezifische Farbstoffe, deren Brauchbarkeit an höheren Organismen erprobt ist, dürfen an Cyanophyceen nicht ohne Zuziehung weiterer cytochemischen Kontrollen angewendet werden.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. G. PIEKARSKI, danke ich für Anregung zu der Arbeit und ihre fortwährende Förderung. Den Herren der Anstalt für Bodenseeforschung in Konstanz und der Bayer. Biol. Versuchsanstalt in München danke ich für die Überlassung von Material, Herrn Prof. Dr. E. G. PRINGSHEIM für die Bestimmung der *Oscillatoria amoena*. Herr Dr. M. PONTIERI überließ mir dankenswerter Weise kristallisierte Ribonuclease.

Nachtrag. Nach Abschluß der Arbeit sind zum gleichen Thema noch zwei Arbeiten erschienen, die hier kurz erwähnt werden sollen: DRAWERT u. METZNER (Ber. dtsch. bot. Ges. 69, 291, 1956) bestätigen unsere Ergebnisse mit den Fluoreszenzanalytischen Verfahren und ergänzen sie in wünschenswerter Weise. Daß der Chromatinapparat, wie er mit der Nuclealreaktion dargestellt wird, in der „Zentralsubstanz“ nach VON ZASTROW gleichsam eingebettet liegt, entspricht nicht unserer Auffassung. Wir halten beide Strukturen auch nach unseren Fluoreszenzuntersuchungen für identisch, die „Zentralsubstanz“ aber bei VON ZASTROW als mißverständlich beschrieben. Die Polyphosphatkörper sind nach unserer Auffassung keine Entmischungskörper, da sie, wie BRINGMANN bereits abgebildet hat, im Phasenkontrastmikroskop dargestellt werden können. — In einer Arbeit von TISCHER (Arch. Mikrobiol. 1957, im Druck), die uns durch die Freundlichkeit von Herrn Prof. Dr. A. RIPPEL zugänglich wurde, werden Ergebnisse mitgeteilt, die grundsätzlich mit den unseren vereinbar sind.

Literatur

- BAHR, G. F.: Galloeyanin-indiumalum. *Exper. Cell. Res.* **5**, 551 (1953). —
 BOIVIN, A., R. TULASNE, R. VENDRELY et R. MINCK: Le noyau des bactéries. *Cytologie et cytochimie des bactéries normales et des bactéries traitées par la pénicilline*. *Arch. Sci. physiol.* **1**, 307 (1947). — BORCHERT, R., u. J. G. HELMCKE: Bemerkungen zur Fluorochromierung lebender und toter Zellen mit Akridinorange. *Naturwissenschaften* **37**, 565 (1950). — BORGERT, A.: Kern- und Zellteilungen bei marinen Ceratium-Arten. *Arch. Protistenkde.* **20**, 1 (1910). — BORZI, A.: Le comunicazioni intracellulari delle Nostochinee. *Malpighia* **1**, 74, 97, 145, 197, (1887). — BRACHET, J.: La détection histochimique des acides pentose-nucléiques. *C. r. Soc. Biol. (Paris)* **133**, 88 (1940). — BRINGMANN, G.: Vergleichende licht- und elektronenoptische Untersuchungen an Oszillatorien. *Planta (Berl.)* **38**, 541 (1950). — BÜTSCHLI, O.: Über den Bau der Bakterien und verwandter Organismen. Leipzig 1890.
- CASSEL, W. A.: A procedure for the simultaneous demonstration of the cell walls and chromatinic bodies of bacteria. *J. Bacter.* **62**, 239 (1951). — CASSEL, W. A., and W. G. HUTCHINSON: Nuclear studies on the smaller myxophyceae. *Exper. Cell. Res.* **6**, 134 (1954). — CHATTON, E.: Les Péridiniens parasites. Morphologie, reproduction, éthologie. *Arch. zool. exper.* **59**, 1 (1918). — CHATTON, E., et R. POISSON: Sur l'existence dans le sang des crabes de Péridiniens parasites. *C. r. Soc. biol. (Paris)* **105**, 553 (1930).
- DEHORNE, A.: Contribution à l'étude comparée de l'appareil nucléaire des Infusoires ciliés, des Euglènes et des Cyanophycées. *Arch. Zool. exper.* **60**, 47 (1920). — DRAWERT, H.: Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen. I. Mitt.: Literaturübersicht und Versuche an Oscillatoria borneti Zukal. *Planta (Berl.)* **37**, 161 (1949).
- EBEL, J. P.: Recherches sur les polyphosphates, contenus dans les diverses cellules vivantes. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)* **24**, 321, 330, 491, 498 (1952). — EBEL, J. P., et J. COLAS: Etude cytochimique des corpuscules métachromatiques des levures et des divers microorganismes. VIIIe Congr. int. de Bot. Paris 1954, Rapp. et Comm. parvenus avant le Congrès, Sect. 21, p. 36. — ENTZ, G.: Über die mitotische Teilung von Ceratium hirundinella. *Arch. Protistenkde.* **43**, 416 (1921).
- FEULGEN, R. u. H. ROSSENBECK: Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Z. physiol. Chem.* **135**, 203 (1924). — FOGG, G. E.: Growth and heterocyst production in Anabaena cylindrica LEMM. III: The cytology of heterocysts. *Ann. of Bot. N. S.* **15**, 24 (1951). — FRITSCH, F. E.: Studies on Cyanophyceae II: Structure of the investment and spore-development in some Cyanophyceae. *Beih. Bot. Zbl.* **18**, 194 (1905). — The structure and reproduction of algae, Vol. II., Cambridge University Press 1945. — FUHS, G. W.: Über den sog. „Chromidialapparat“, die „Haplomitose“ und das „Volutin“. Dipl.-Arb. z. Erl. d. Grades Diplom-Biologe, Math.-naturwiss. Fak. Univ. Bonn 1956a. — Zur Cytologie physiologisch junger Zellen von Oscillatoria amoena (Kütz.) Gom., Dissertation, Math.-naturwiss. Fakultät, Univ. Bonn 1956b.
- GARDNER, N. L.: Cytological studies in Cyanophyceae. *Univ. California Publ.* **2**, 237 (1906). — GEITLER, L.: Schizophyceen in: Linsbauers Handbuch der Pflanzen-anatomie Abt. II, Bd. IV/1, B. Berlin 1936. — Schizophyta in: Natürliche Pflanzenfamilien 2. Aufl., Leipzig 1942. — GRELL, K. G.: Der Generationswechsel des parasitischen Suktors Tachyblaston ephelotensis MARTIN. *Z. Parasitenkde.* **14**, 499 (1950). — Die Chromosomen von Aulacantha scolymantha HAECKEL. *Arch. Protistenkde.* **99**, 1 (1953). — GUILLIERMOND, A.: Contribution à l'étude cytologique des Cyanophycées. *Rev. gén. Bot.* **18**, 392, 447 (1906). — Nouvelles recherches sur la structure des Cyanophycées. *Rev. gén. Bot.* **38**, 129, 177 (1926). — La structure

des Cyanophycées. C. r. Acad. Sci. (Paris) **197**, 182 (1933). — GUILLIERMOND, A., G. MANGENOT et L. PLANTEFOL: Traité de cytologie végétale. Paris 1933.

HARTMANN, M.: Allgemeine Biologie, 4. Aufl. Stuttgart 1953. — HAUPT, A. W.: Cell structure and cell division in the Cyanophyceae. Bot. Gaz. **75**, 170 (1923). — HEGLER, R.: Untersuchungen über die Organisation der Phycocchromaceenzellen. Jb. wiss. Bot. **36**, 229 (1901). — HERBST, F.: Strahlenbiologische und cytologische Untersuchungen an Blaualgen. Diss. phil. Fak. Köln 1952. — Zytologische Untersuchungen an Cyanophyceen. Ber. dtsh. bot. Ges. **66**, 283 (1953). — Über die Kernäquivalente von *Aphanthece caldarium* und *Pseudanabaena catenata* Lauterb. Ber. dtsh. bot. Ges. **67**, 183 (1954). — HIERONYMUS, G.: Beiträge zur Morphologie und Biologie der Algen. COHNS Beitr. Biol. Pfl. **5**, 461 (1892). — HUSKINS, C. L.: Nuclear reproduction. Int. Rev. Cytol. **1**, 9 (1950).

JAAG, O.: Schweiz. Z. Hydrol. **9**, 16 (1941) [zit. n. JAAG, Fortschr. Bot. **12**, 49 (1949)]. — JACKSON, B., and F. J. DESSAU: Streptococcal desoxyribonuclease for the removal of Feulgen-stainable material. Stain Technol. **30**, 9 (1955). — JACOBSON, W., and M. WEBB: The two types of desoxyproteins during mitosis. Exper. Cell. Res. **3**, 163 (1952). — JAKOB, H.: Influence de la colchicine sur le développement de certaines Algues d'eau douce. C. r. Acad. Sci. (Paris) **230**, 1203 (1950).

KAUFMANN, B. P., H. GAY and M. R. McDONALD: Enzymatic degradation of ribonucleoproteins. Amer. J. Bot. **38**, 268 (1951). — KNAYS, G.: The structure, composition, and behavior of the nucleus of *Bacillus cereus*. J. Bacter. **69**, 117 (1955). — KÖLBEL, H.: Die Lichtfilter im Fluoreszenzmikroskop zur Darstellung des *Mycobacterium tuberculosis*. Naturwissenschaften **40**, 457 (1953). — KRIEG, A.: Fluoreszenzanalyse und Fluorochrome in Biologie und Medizin. Klin. Wschr. **1953**, 350. — Nachweis von Kernäquivalenten in Zyanophyceen. Experientia (Basel) **10**, 204 (1954). — KUNITZ, M.: Crystalline ribonuclease. J. Gen. Physiol. **24**, 15 (1940). — Crystalline desoxyribonuclease I. Isolation and general properties... J. Gen. Physiol. **33**, 349 (1950). — KURNICK, N. B.: The basis for the specificity of methylgreen-staining. Exper. Cell Res. **3**, 649, 1952. — Histological staining with methylgreen-pyronin. Stain Techn. **27**, 233 (1952).

LESSLER, M. A.: The nature and specificity of the Feulgen nuclear reaction. Int. Rev. Cytol. **2**, 231 (1953). — LI, C. F., and M. STACEY: The degradation of sperm desoxyribonucleic acid. Nature (Lond.) **163**, 538 (1949).

MARQUARDT, H.: Karyotische Vererbung. Kerngesteuerte Vererbungserscheinungen. Naturwissenschaften **40**, 69 (1953). — METZNER, I.: Zur Chemie und zum submikroskopischen Aufbau der Zellwände, Scheiden und Gallerten von Cyanophyceen. Arch. Mikrobiol. **22**, 45 (1955). — MEYER, A.: Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins. Bot. Ztg. **62**, 113 (1954). — MURRAY, R. G. E.: The problem of fixation for studies of bacterial nuclei. Symp. Citologia batterica Rom 1953.

NADSON, G.: Über den Bau des Cyanophyceenprotoplasten. Scripta bot. St. Petersburg IV, 1895. — NEUGNOT, D.: Contribution à l'étude cytochimique des Cyanophycées par application des techniques de mise en évidence de l'appareil nucléaire chez les bactéries. C. r. Acad. Sci. (Paris) **230**, 1311 (1950). — NEUMANN, F.: Die Frage nach dem Kern der Bakterien und ihre Beantwortung mit Hilfe der Nuklealfärbung. Berl. tierärztl. Wschr. **1930**, 101.

PETERS, D., u. R. WIGAND: Enzymatisch-elektronenoptische Analyse der Nucleinsäureverteilung, dargestellt an *Escherichia coli* als Modell. Z. Naturforsch. **8b**, 180 (1953). — PETER, H. F. M.: La réaction nucléaire de Feulgen chez quelques végétaux inférieurs. C. r. Acad. Sci. (Paris) **197**, 88 (1933). — PFEIFFER, H.: Neue Versuche zur Leptonik intermitotischer Zellkerne. Exper. Cell Res. **2**, 279, (1951). — PIEKARSKI, G.: Cytologische Untersuchungen an *Paratyphus*- und *Colibacterien*.

Arch. Mikrobiol. 8, 428 (1937). — Haben Bakterien einen Zellkern? Zur Definition des Zellkerns. Naturwissenschaften 37, 201 (1950). — POLJANSKY, G., u. G. PETRUSCHENSKY: Zur Frage über die Struktur der Cyanophyceenzelle. Arch. Protistenkunde. 67, 11 (1929). — POLLISTER, A. W., and LEUCHTENBERGER, C.: The nature of the specificity of methyl green for chromatin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 33, 111 (1949). — POUYET, J.: L'acide chlorhydrique, succédané de la ribonucléase, dans l'élimination de l'acide ribonucléique chez les cellules des êtres supérieurs aussi bien que chez les bactéries; aspect chimique de la question. C. r. Acad. Sci. (Paris) 228, 608 (1949). — PRAT, S.: Beitrag zur Kenntnis der Organisation der Cyanophyceen. Arch. Protistenkunde. 52, 142 (1925).

REICHENOW, E.: Ergebnisse mit der Nuklealfärbung bei Protozoen. Arch. Protistenkunde. 61, 144 (1928).

SANDERS, F. K.: Cytochemical differentiation between the pentose and deoxyribose nucleic acids in tissue sections. Quart. J. Micr. Sci. 87, 203 (1946). — SANDRITTER, W., H. DIEFENBACH u. F. KRANTZ: Über die quantitative Bindung von Ribonukleinsäure mit Galloxyaninchromalaun. Experientia (Basel) 10, 21 (1954). — SCHMIDT, G., C. HECHT and S. J. THANNHAUSER: The effect of potassium ions on the absorption of orthophosphate and the formation of metaphosphate by baker's yeast. J. of Biol. Chem. 178, 733 (1949). — SCHÜSSNIG, B.: Handbuch der Protophytenkunde Bd. I, Jena 1953. — SKOCZYLA, O.: Diss. Darmstadt 1954, reprinted in Fortschr. Bot. 18, 1, (1956). — SPEARING, J. K.: Cytological studies on the myxogastrea. Arch. Protistenkunde. 89, 209 (1937). — STENRAM, U.: The specificity of the galloxyanin-chromalum stain for nucleic acids as studied by the ribonuclease technique. Exper. Cell Res. 4, 383 (1953). — STEWART, W. N. and A. M. SCHERTIGER: Brilliant cresyl blue as a stain for plant chromosomes. Stain Technol. 24, 39 (1949). — STICH, H.: Der Nachweis und das Verhalten von Metaphosphaten in normalen, verdunkelten und Trypaflavin-behandelten Acetabularien. Z. Naturforsch. 8b, 34 (1953).

TSCHENZOFF, B.: Die Kernteilung bei *Euglena viridis*. Arch. Protistenkunde. 36, 137 (1916).

VAHLKAMPF, E.: Beiträge zur Biologie und Entwicklungsgeschichte von *Amoeba limax* einschließlich der Züchtung auf künstlichen Nährböden. Arch. Protistenkunde. 5, 67 (1905). — VENDRELY-RANAVEL, C.: Substitution de l'acide chlorhydrique par l'acide ribonucléique pour l'étude de la localisation de l'acide ribonucléique au sein des cellules animales. C. r. Soc. Biol. (Paris) 143, 249 (1949a). — L'acide chlorhydrique succédané de la ribonucléase dans la localisation de l'acide ribonucléique chez les cellules des êtres supérieurs aussi bien que chez les bactéries; aspect histologique de la question. C. r. Acad. Sci. (Paris) 228, 606 (1949 b). — VENDRELY, R., et J. L. PARDY: Acides nucléiques et noyaux bactériens. C. r. Acad. Sci. (Paris) 223, 344 (1946).

WALL, J. S., A. C. WAGENKNECHT, J. W. NEWTON and R. H. BURRIS: Comparison of the metabolism of ammonia and molecular nitrogen in photosynthesizing bacteria. J. Bacter. 63, 563 (1952). — WIAME, J. M.: Basophilie et métabolisme du phosphore chez la levure. Bull. Soc. Chim. biol. 28, 552 (1946). — Étude d'une substance polyphosphorée, basophile et métachromatique chez les levures. Biochim. et Biophysica Acta 1, 234 (1947). — WIGAND, H., u. D. PETERS: Licht- und elektronenoptische Untersuchungen über den Abbau gramnegativer Kokken mit Nucleasen und Proteasen. Z. Naturforsch. 9b, 586 (1954). — WINKLER, A.: The metaphase chromatic granula of bacteria. Symp. Citologia batterica, Rom 1953.

VON ZASTROW, E.-M.: Über die Organisation der Cyanophyceenzelle. Arch. Mikrobiol. 19, 174 (1953). — ZUELZER, M.: Über *Spirochaeta plicatilis* Ehrbg. und deren Verwandtschaftsbeziehungen, Arch. Protistenkunde. 24, 1 (1911).

(Aus dem Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz
der Georg-August-Universität Göttingen)

Untersuchungen zur Keimungsphysiologie des Schwarzrostes *Puccinia graminis tritici* (Pers.) Erickss. u. Henn.

Von

W. H. FUCHS und A. GAERTNER

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. September 1957)

HURD-KARRER u. RODENHISER (1947) zeigten erstmalig, daß bei der Keimung der Uredosporen von *Puccinia graminis* und anderen Rostarten auf Plattenkulturen neben Appressorien auch Hyphenanschwellungen nach Art der in vivo beobachteten substomatären Vesikel gebildet werden, von welchen Hyphen geringeren Durchmessers ausgehen, die offensichtlich den Infektionshyphen entsprechen (vgl. auch DICKINSON 1949—1955), aber sehr bald ihr Wachstum unter den Bedingungen der Plattenkultur einstellen. Sie erreichten auf Nährböden, welche keine oder ungeeignete organische Substrate enthielten, auch in unseren Versuchen nie über $100\ \mu$ Länge. Versuche, diese Entwicklung günstiger zu gestalten (DICKINSON 1949b—d, SHARP and SMITH 1952, SHARP 1954), brachten keine wesentlichen Fortschritte, und trotz anfänglich optimistisch lautender Befunde ist eine Kultur von Pucciniaceen bisher nur auf Gewebeskulturen gelungen (BAUCH u. SIMON 1957, dort weitere Literatur). Im Anschluß an Untersuchungen über das Verhalten von *Phytophthora infestans* auf verschiedenen Kulturmedien wurden von uns früher eingestellte Versuche mit den dort gewonnenen Erfahrungen wieder aufgegriffen. Obgleich diese noch zu keinen entscheidenden Erfolgen führten, scheint es uns doch gerechtfertigt, heute über einige bisher erzielte Ergebnisse zu berichten.

Zu den Untersuchungen wurden Uredosporen von *Puccinia graminis tritici* 5 Tage nach dem Auftreten der Pusteln auf NOS Nordgau Sommerweizen im Lichtthermostaten herangezogen (aus dem Innern der Pusteln mit einem in 70% Alkohol desinfizierten, spitzen Pinsel entnommen und auf den Kulturplatten durch leichtes Aufstoßen möglichst gleichmäßig verteilt). Zur Vermeidung von Fremdinfekten ist bei der Sporenentnahme eine Berührung der sterilen Blattflächen peinlich zu vermeiden. Die Kulturen (Petri-Schalen 5 cm \varnothing , 2 cm Höhe) wurden im Dunkeln bei 22°C bebrütet und nach 4, 6 und 10 Tagen zur Beobachtung geöffnet. Die Entwicklung der Keimschläuche mußte subjektiv beurteilt werden, da infolge ihres gewundenen oder spiraligen Wachstums und der unvermeidlich wechselnden Dichte der Sporenaussaat die Zuordnung der „Hyphen“ und Vesikel zu einer bestimmten Spore nur im wechselnden Prozentsatz möglich war. Somit erschien uns eine Messung der „Hyphen“ vertretbar. Bei dieser wurden die Längen und die Seitenzweige

der „Hyphen“ zusammengezählt (in Tabellen durch Doppelkreuz gekennzeichnet). Daneben wurde der Prozentsatz der von den Keimschläuchen gebildeten Vesikel geschätzt; die relative Eignung eines Nährbodens wurde in erster Linie auf Grund der erzielten maximalen Hyphenlängen bewertet, jedoch nur dann, wenn eine größere Zahl von ähnlichen Wachstumsbildern in einer Kulturschale vorlag.

In Vorversuchen wurden die von HURD-KARRER u. RODENHISER (1947) an der Rasse 56 gewonnenen Ergebnisse mit der von uns zuers verwendeteten Rasse 126a im wesentlichen bestätigt. Auch der später äußeren Gründen notwendige Übergang zur Rasse 32 ergab keine grundsätzlich anderen Bilder, wenn auch Rasse 126a im Gegensatz zu Rasse 56 (HURD-KARRER u. RODENHISER 1947) unter den früher bekannten Kulturbedingungen nur selten und stets endständige Vesikel anlegte und Rasse 32 sich in unseren Versuchen unter vergleichbaren Bedingungen durch eine etwas geringere und verzögerte „Hyphen“-entwicklung von Rasse 126a abhob. Im Gegensatz zu SHARP and SMITH (1952) konnte auf Gelatinenährböden (Gelatine für Nährboden zwecke Merck) weder mit, noch ohne Zugabe von Zinksulfat Vesikelbildung beobachtet werden. Eine Vorbehandlung der verwendeten Gelatine und auch des verwendeten Agars mit Aktivkohle beeinflusste unsere Ergebnisse nicht. Das gegen bildeten etwa 10% der gekeimten Sporen der Rasse 126a Vesikel aus, als wir Kieselgel nach TAYLOR (1950) als weitgehend indifferentes Substrat unter sonst gleichen Bedingungen verwendeten. Hier fanden sich auch häufig kurze Ansätze von „Hyphen“. Dies bestätigt die von SHARP (1954) beobachtete Begünstigung der Vesikelbildung durch Silic con. Die weiteren Versuche wurden daher ausschließlich mit Kieselgel durchgeführt, da dieses auch die genaue Einstellung des pH erleichtert und die Zugabe hitzeempfindlicher Stoffe (gegebenenfalls nach Filtration durch Bakterienfilter) zu den Nährböden ermöglichte.

Anfänglich wurde das Kieselgel durch Verfestigung eines Kieselsäurelös, hergestellt aus einer 3% Natriumsilicatlösung (Merck) mittels $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ gewonnen, später durch Zugabe eines jeweils frisch hergestellten Puffergemisches¹, nachdem sich gezeigt hatte, daß die da

¹ Das Gemisch besteht aus 2 g K_3PO_4 , 2 g $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ und 4 ml n/10 NaOH auf 100 ml bidestilliertem Wasser. Durch geeignete Variationen der der Kieselsäurelösung zugegebenen Puffermenge läßt sich der Säuregrad des Gels innerhalb der hier notwendigen Grenzen (pH 5–7) sehr genau und gut reproduzierbar einstellen, jedoch müssen die genauen Mengen für jede neu hergestellte Kieselsäurelösung gesondert ermittelt werden. Die zur Verfestigung nötige Salzkonzentration von weniger als 0,08% liegt im Bereich der in Nährböden üblichen Konzentration. Es ist zweckmäßig, die Salze durch Zugabe von 12,5 mg $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 3,1 mg KNO_3 , 3,1 mg KH_2PO_4 und 3,1 mg MgSO_4 in Form von 12,5 ml Knopscher Nährlösung in 100 ml Nährboden zu ergänzen (vgl. GAERTNER 1957).

Sorgfältige Reinigung des verwendeten Schottfilters G 5 ist von größter Bedeutung, da Spuren organischer Substanzen, welche durch Zersetzung von Zuckern vielleicht durch die Tätigkeit von Mikroorganismen, entstehen, hemmend wirken. Aus dem gleichen Grunde ist immer frisch bereitetes Puffergemisch zu verwenden.

durch mögliche genaue Einstellung des p_H -Wertes unter gleichzeitiger Zugabe von Salzen der Knopschen Nährlösung das „Hyphen“-wachstum sehr begünstigt.

In den ersten Versuchsreihen wurden als Nährstoffe in wechselnder Konzentration, einzeln und im Gemisch, verschiedene Zucker (Glucose, Fructose, Saccharose, Maltose), geringe Mengen von Pepton und Biomalz, Spuren von Glucosamin, Glutamin, Ribose und wasserlöslichen Vitaminen zugesetzt, ohne daß erhebliche Verbesserungen des „Hyphen“-wachstums von Rasse 126a erzielt wurden. Auch frisch mit Quarzsand

Tabelle 1. p_H -Wert und Vesikelbildung.
Versuch vom 7. 11. und 23. 11. 1955 (Rasse 126a)

p_H	Vesikelbildung	Meßwerte d. jeweils längsten „Hyphen“ in μ	p_H	Vesikelbildung	Meßwerte d. jeweils längsten „Hyphen“ in μ
7,15	+	$\pm 1\ 050^*$	7,01	++	$\pm 1\ 540$
7,12	++	$\pm 1\ 110^*$	6,92	+	$\pm 1\ 680$
7,09	+	$\pm 1\ 350$	6,90	+	$\pm 1\ 050$
7,08	+	$\pm 1\ 770^*$	6,59	++	$\pm 1\ 239$
7,05	+	$\pm 2\ 660^*$	6,31	+	$\pm 1\ 125$
7,03	++	$\pm 1\ 740$	6,00	+	350

* Versuch vom 23. 11. 1955. + Vesikelbildung bis zu 10%. ++ Vesikelbildung bis 10—20%. \pm Summe der Verzweigungen in μ .

verriebene Blatt- und Halmgewebe von Weizen sowie frische Leber ergaben keine bedeutende Förderung. Eine solche wurde dagegen erzielt, als in Anlehnung an Beobachtungen über das Keimschlauchwachstum von *Erysiphe* (YARWOOD and COHN 1949) frisches, dem Dottersack steril entnommenes Hühnereigelb (15 Tropfen je 100 ml Nährboden) zugesetzt wurde. Auf ungepuffertem, mit $(NH_4)_2HPO_4$ gefälltem Kieselgel mit 0,3 g Glucose und 15 Tropfen Eigelb je 100 ml konnten bereits Hyphenlängen bis zu 450 μ erreicht werden. Auf gepuffertem Kieselgel nach Beigabe der Knopschen Nährlösung und einer Spur von Glucosamin wurden bis zu 707 μ gemessen, und nach genauer Einstellung optimaler p_H -Bedingungen (vgl. Tab. 1) im Optimalbereich von p_H 7,03—7,08 Gesamtlängen der verzweigten „Hyphen“ von 1740 — sogar 2660 μ bei Rasse 126a — beobachtet. Unter gleichen Bedingungen wurden mit Rasse 32, welche nach Verlust der Rasse 126a im Winter 1956 herangezogen werden mußte, nur maximale „Hyphen“längen von 420 μ erzielt, unter Berücksichtigung der Tatsache, daß das optimale p_H für diese Rasse etwas tiefer, bei 6,85—6,95, liegt.

Bei weiteren Untersuchungen mit Rasse 32 war, ebenfalls in Anlehnung an inzwischen mit der Kultur von *Phytophthora infestans* gesammelte Erfahrungen (GAERTNER 1957), der Einfluß von Eisensalzen, Vitaminen und Aminoverbindungen auf das „Hyphen“-wachstum zu untersuchen.

Zugabe verhältnismäßig hoher Fe-Konzentrationen als Chlorid, Citrat und Lactat förderten deutlich. Der stärkste Effekt wurde mit Eisensaccharat DAB 6 (2,2 mg je 100 ml) mit einer „Hyphen“-länge von 720 μ gegenüber 420 μ auf dem „normalen“ Glucose-Eigelbnährboden erzielt.

Zugabe von Thiamin, Lactoflavin, Folsäure, Paraminobenzoessäure, Vitamin B 12, Biotin, Nicotinsäureamid, Calciumpantothenat und Inositol wirkte sich weder mit, noch ohne Eisenzugabe positiv aus. Pyridoxin zeigte dagegen eine konzentrationsabhängige Förderung der „Hyphen“-ausbildung mit einem Optimum von etwa 1 mg je 100 ml. Rasse 32 erreichte eine Gesamthyphenlänge von 1060 μ auf einem gepufferten Kieselgel, das je 100 ml 0,3 Glucose, 12,5 ml Knopscher Nährlösung, 1 mg Pyridoxin, 2,2 mg Eisensaccharat und 15 Tropfen Eigelb enthielt. Dieser Nährboden bildet die Grundlage für die Untersuchung des Einflusses verschiedener Aminosäuren und Amide (vgl. Tab. 2). α - und β -Alanin, Valin, Histidin, Lysin und Threonin hemmten Entwicklung und Verzweigung der „Hyphen“ deutlich. Relativ gute Hyphenentwicklung, jedoch keine überdurchschnittlichen Werte, konnte mit Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure und Arginin erzielt werden. Hemmende Wirkung von Glutamin war früher bereits in anderen Versuchen festgestellt worden. Auffällig ist die günstige Wirkung des Leucins, des Glutathions und des Cysteins. Cysteinzugabe begünstigte offensichtlich auch die Ausbildung einzelner „Hyphen“, die sich keinem Vesikel zuordnen lassen, sondern

Tabelle 2. Wirkung von Aminosäuren. (Rasse 32)

	Vesikelbildung	Meßwerte d. jeweils längsten „Hyphen“ in μ
α -Alanin	+	120
β -Alanin	+	160
Arginin	+	± 790
Asparaginsäure	+	± 620
Asparagin	+	± 980
Glutaminsäure	+	± 750
Cystein	++++	± 1 850 (± 3300)
Histidin	+	100
Leucin	++	± 1 790
Lysin	+	250
Threonin	+	320
Tryptophan	+	130
Valin	+	110
Glutathion ¹	+++	± 1 110
ohne Amino-Verbindung	+	± 770

Aminosäuren und Amide 0,0025 mol zugesetzt.

¹ Glutathion 0,0005 mol zugesetzt.

() „Hyph“, nicht einem Vesikel zuzuordnen. + bis 10%, ++ 10–20%, +++ 20–30%, ++++ 30–40% der Keimschläuche, welche Vesikel mit „Hyphen“ gebildet hatten. ± Summe der Verzweigungen in μ .

an der Basis oder auch an anderen Stellen des Keimschlauches gebildet werden. In Form kleiner Auswüchse wurde solches auch in anderen Fällen beobachtet. Nach Cysteinzugabe bildeten sich lange, verzweigte Hyphen, die in einem Falle eine Gesamtlänge von $3300\ \mu$ erreichten.

Die drei positiv wirkenden Aminoverbindungen, vor allem aber Glutathion und Cystein, begünstigen außerordentlich die Vesikelbildung (vgl. Tab. 2). Dies geht noch deutlicher aus einem Versuch hervor, in welchem

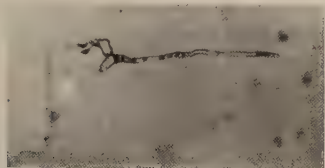


Abb. 1. Keimschlauch, Appressorium, substomatäres Vesikel, einseitig ausgewachsen, „Hyph“ unverzweigt. Vergrößerung $135\times$



Abb. 2. Keimschlauch, Appressorium, substomatäres Vesikel, einseitig ausgewachsen, „Hyph“ verzweigt. Vergrößerung $135\times$

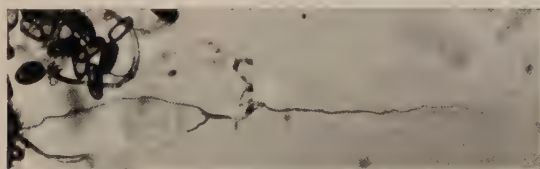


Abb. 3. Wie Abb. 2, beidseitig ausgewachsen, einseitig verzweigt. Vergrößerung $135\times$



Abb. 4. Wie Abb. 3, beidseitig verzweigt. Vergrößerung $135\times$

der Zusatz von Eigelb zum Nährboden weggelassen, dafür aber 0,6, 1,2 und 2,5 mmol Cystein zugefügt wurden. Die Auszählung von je 600 gekeimten Sporen ergab 18 bzw. 21 bzw. 29% Vesikelbildung nach Cystein-zusatz gegenüber von etwa 10% in allen früheren Versuchsreihen, in welchen Cystein nicht zugesetzt wurde. Auch vor dem Autoklavieren zugesetztes Cystein zeigte die gleiche Wirkung. Die nach Cysteinzusatz in Abwesenheit von Eigelb gebildeten „Hyphen“ erreichten dagegen nur $700\ \mu$ und blieben damit wesentlich unter den in Tab. 2 angeführten Werten.

Cystein fördert also für sich allein die Vesikelbildung. Seine günstige Wirkung auf das Längenwachstum der „Hyphen“ ist aber an die Gegenwart von Eigelb gebunden.

Abb. 1—6 zeigen die Größenverhältnisse der Sporen, Keimschläuche, Vesikel und „Hyphen“ sowie die Art des Wachstums und der Verzweigung dieser „Hyphen“. Sie machen deutlich, daß auf annähernd neutraler Kieselgallerte unter Zusatz von Glucose, verschiedenen Ionen und nicht denaturiertem Hühnereigelb eine relativ weitgehende Entwicklung von Rostmycel möglich ist, wenn gleichzeitig Pyridoxin,

Eisen und bestimmte Aminosäuren zugegen sind.



Abb. 5. Spore, Keimschlauch, Appressorium, substomatäres Vesikel, beidseitig ausgewachsen; Keimschlauch enthält noch Plasma, Vergrößerung 270 \times

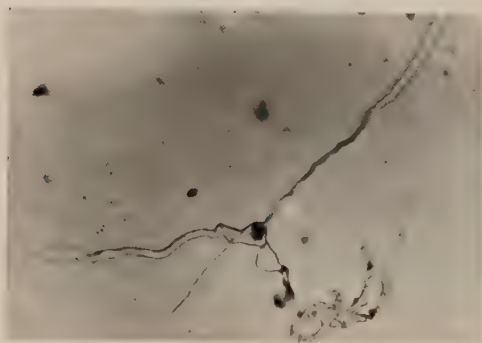


Abb. 6. Keimschlauch, Appressorium, substomatäres Vesikel, beidseitig ausgewachsen; Appressorium vom Vesikel durch Septe getrennt; Keimschlauch und Appressorium von Plasma frei, Keimschlauch kollabiert. Vergrößerung 270 \times

Zu eingehender Diskussion sind die vorliegenden Befunde noch nicht reif. Sie deuten darauf hin, daß SH-haltige Redoxsysteme (Cystein, Glutathion) in Gegenwart relativ hoher Eisenmengen besonders stark die Vesikelbildung, aber auch deutlich das „Hyphen“-wachstum fördern; letzteres allerdings nur in Gegenwart von nativem Eigelb, über dessen eigentlich wirksame Bestandteile nach dem bisherigen Stand der Untersuchungen noch nichts Endgültiges ausgesagt werden kann. In diesem Zusammenhang ist der hohe Cysteingehalt der Uredo-Sporen (ROHRINGER 1957) vielleicht als weiterer Hinweis auf die besondere Bedeutung SH-haltiger Bausteine für den Stoffwechsel der Rostpilze bedeutungsvoll. Gleiches gilt für den hohen Gehalt an Glutaminsäure-Glutamin in den Sporen, hinsichtlich der Deutungsmöglichkeit der in

unseren Versuchen augenfälligen Förderung des „Hyphen“-wachstums durch Pyridoxin, des Cofermentes der Transaminase und anderer für den Aminosäurehaushalt wichtiger Fermente. Vielleicht ist die Intensität der Transamination ein Schlüsselfaktor für das Wachstum der Rostpilze, wobei offen bleibt, ob die fördernde Wirkung von Leucin vom gleichen Blickpunkt her betrachtet werden darf. Diese ist auch dadurch be-

deutungsvoll, daß wenigstens unter gewissen Bedingungen Rostbefall an Weizen in Pyridoxin-gesteuerte Fermentprozesse einzugreifen scheint, wie u. a. aus den Daten von ROHRINGER (1957) hervorgeht. Diese Möglichkeiten sollen an anderer Stelle näher erörtert werden.

Zusammenfassung

Versuche, in Plattenkulturen weitergehende Entwicklungsstadien der Keimschläuche von Uredosporen des Schwarzrostes, *Puccinia graminis tritici* zu erhalten, werden beschrieben. Es fördern Eisenverbindungen, nicht denaturiertes Hühnereigelb, Cystein, Leucin und Glutathion sowohl die Ausbildung der Vesikel als auch das Längenwachstum der Infektionshyphen bei Gegenwart von Pyridoxin.

Wir durften von der Deutschen Forschungsgemeinschaft bereitgestellte Mittel und Geräte mitbenutzen und danken auch an dieser Stelle für diese Hilfe.

Literatur

BAUCH, R., u. U. SIMON: Kulturversuche mit Rostpilzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **70**, 145—155 (1957). — DICKINSON, S.: Studies in the physiology of obligate parasitism. I. The stimuli determining the direction of growth of the germ-tubes of rust and mildew spores. Ann. Bot. NS **13**; (49), 89—104 (1949a). — II. The behavior of the germ-tubes of certain rusts in contact with various membranes. Ann. Bot. NS **13** (50), 219—236 (1949b). — III. The growth of rust mycelium out of infected leaves. Ann. Bot. NS **13** (51), 337—343 (1949c). — IV. The formation on membranes of haustoria by rusthyphae and powdery mildew germ-tubes. Ann. Bot. NS **13** (51), 345—353 (1949d). — V. Further differences between uredospores germ-tubes and leafhyphae of *Puccinia triticea*. Ann. Bot. NS **19** (74), 161—171 (1955). — GAERTNER, A.: Versuche zur künstlichen Kultur von *Phytophthora infestans* de Bary. Zbl. Bakter. II. Abt. **110** (1957) (im Druck). — HURD-KARRER, ANNIE, M., and H. A. RODENHISER: Structures corresponding to appressoria and substomatal vesicels produced on nutriment solution agar by cereal rusts. Amer. J. Bot. **34**, 377—384 (1947). — ROHRINGER, R.: Untersuchungen zur Biochemie der Weizenpflanzen nach Infektion mit *Puccinia graminis tritici* (Pers.) Erickss. u. Henn. Phytopath. Z. **29** (1), 45—64 (1957). — SHARP, E. L.: Lyophilisation and germ-tube development of *Puccinia uredospores*. Iowa State Col. J. Sci. **28**, 398—399 (1954). — SHARP, E. L., and F. G. SMITH: The influence of pH and zink on vesicel formation in *Puccinia coronata avenae corda* Phytopathology **42**, 581 (1952). — STOCK, F.: Untersuchungen über Keimung und Keimschlauchwachstum der Uredosporen einiger Getreideroste. Phytopath. Z. **3**, 231—279 (1931). — TAYLOR, C. B.: An improved method for the preparation of silica gel media for microbiological purpose. J. Gen. Microbiol. **4**, 235—237 (1950). — YARWOOD, C. E., and M. COHN: Diurnal responsiveness of *Erysiphe graminis* to nutrients. Science (Lancaster, Pa.) **110**, 477—478 (1949).

(Aus dem Institut für Forstbotanik, Eberswalde)

Die Induktion der Laccase-Bildung bei *Collybia velutipes* Curt.

Von

HORST LYR

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. September 1957)

Laccase wird von zahlreichen holzerstörenden und bodenbewohnenden Basidiomyceten als Ektoenzym ausgeschieden (BOIDIN 1951, LINDBERGA u. HOLM 1952, FÄHRÆUS 1952, HIGUCHI u. KITAMURA 1953, LYR 1956, 1958). Bei allen bisher genauer untersuchten Arten erwies sich die Bildung des Fermentes als konstitutiv bedingt. Bei *Polyporus versicolor* Fr. und *Marasmius scorodonius* Fr. läßt sich jedoch die Laccase-Bildung auf einigen Nährböden durch Zusatz bestimmter Chemikalien stark stimulieren (FÄHRÆUS 1953, FÄHRÆUS u. TULLANDER 1956).

Von besonderem Interesse war in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß bei *Collybia velutipes*, die bei normalem Wachstum auf den üblichen Nährböden keine Laccase bildet, die Enzymsynthese durch verschiedene Eingriffe induziert werden kann. Diese Tatsache hat zweifellos für den Pilz auch ökologische Bedeutung, worauf in diesem Zusammenhang aber nicht ausführlicher eingegangen werden soll.

Für einen qualitativen Vortest auf Laccase-Induktion wählte ich folgendes Verfahren an. Der Pilz wurde in Petri-Schalen auf einem Nährboden von 3% Malzextrakt + 0,005% α -Naphthol + 3% Agar kultiviert (LYR 1958). Die α -Naphtholmenge ist nach Vorversuchen so gewählt worden, daß ein normales Pilzwachstum ermöglicht wird und gleichzeitig beim Auftreten von Laccase eine deutliche Verfärbung nach Blauviolett zu erkennen ist.

Wenn das Mycel einen Durchmesser von etwa 4 cm erreicht hatte, wurden die zu prüfenden Substanzen an zwei diametral entgegengesetzten Punkten in etwa 2 cm Entfernung von dem Mycelrand auf den Agar aufgetragen, soweit möglich in fester Form oder bei Flüssigkeiten in höchstmöglicher Konzentration. Da die Mehrzahl der Stoffe gut wasserlöslich ist, ergaben sich bald Diffusionszonen, so daß die Hyphen im Laufe der Zeit mit steigenden Konzentrationen der betreffenden Substanz in Berührung kamen. Bei Laccase-Induktion wird der Nährboden durch das ausgeschiedene Enzym blauviolett gefärbt (Abb. 5). Dadurch lassen sich Ort und Umfang der Induktionswirkung gut erkennen. Das

Verfahren ermöglicht es, in kurzer Zeit eine größere Zahl von Verbindungen auf ihre Induktionswirkung zu untersuchen.

Vergleichende Versuche ergaben, daß gleiche Resultate bei Kultur auf einfachem Malz-Agar und durch einen Laccase-Nachweis mit dem Benzidin-Test (LYR 1958) erzielt werden. Ebenso gaben die Verwendung von Guajacol als Indicatorsubstanz und ein synthetischer Nährboden (3% Glucose; 0,1% Asparagin; 0,005% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,015% KH_2PO_4 ; 0,5 γ Vitamin B_1 /ml; 3,0% Agar) grundsätzlich gleiche Ergebnisse. Quantitative Versuche erwiesen aber, daß die Laccase-Bildung auf dem synthetischen Nährboden geringer ist, weshalb für die hier zu beschreibenden Versuche 3% Malz als Grundnährmedium verwendet wurde. Orientierende Versuche mit anders zusammengesetzten Nährböden zeigten, daß offenbar das C: N-Verhältnis die Stärke der Induktion beeinflussen kann.

In den Tab. 1—5 sind die wichtigsten der geprüften Substanzen zusammengefaßt und das Ausmaß der durch sie hervorgerufenen Laccase-Bildung und Wachstumshemmung bonitätsmäßig angegeben. Als Abstufungen sind die Werte 0 bis + + + benutzt. Aus ihnen ist ersichtlich, daß zwar viele Substanzen eine Wachstumshemmung hervorrufen, daß aber Wachstumshemmung und Laccase-Induktion nicht notwendig gekoppelt sind. Nicht alle Hemmstoffe führen zu einer Induktion. Vielmehr

Tabelle 1. Wirkung verschiedener Säuren auf die Laccase-Induktion

Substanzen	Wachstums-hemmung	Induktion	Substanzen	Wachstums-hemmung	Induktion
Citronensäure	++	++	Adipinsäure	++	0
Bernsteinsäure	+	++	Malonsäure	++	++
Fumarsäure	+	+	Mono-Fluoressigsäure . .	++	0
Äpfelsäure	+	++	Mono-Chloressigsäure . .	++	+
α -Ketoglutarinsäure . . .	(+)	0-(+)	Mono-Jodessigsäure . .	++	+
Oxaleessigsäure	0	0	Tri-Chloressigsäure . .	+++	0
Milchsäure	++	+	Schwefelsäure, konz. . .	+++	0-(+)
Eisessig	+++	0	Salzsäure, konz. . . .	++	0
Brenztraubensäure . . .	++	++	Phosphorsäure, konz. . .	++	0
Ameisensäure 96%ig . .	+	0			

haben sich nur folgende chemisch sehr verschiedene Substanzen als wirksam erwiesen: Pentachlorphenol, 2,6-Dinitro-o-Kresol, (2,4-Dinitrophenol), p-Chlor-Mercuribenzoat, Tannin, (Pyrogallol), (Brenzcatechin), Thioharnstoff, Malonsäure, Mono-Jodessigsäure, Mono-Chloressigsäure, Citronensäure, Fumarsäure, Bernsteinsäure, Äpfelsäure, Brenztraubensäure, Milchsäure. Es fällt auf, daß mit Ausnahme von Tannin, wenn man von Pyrogallol und Brenzcatechin zunächst absieht, keine Substanzen darunter sind, die als typische Substrate für Laccase gelten können. Eine adaptive Enzymbildung liegt demnach nicht vor, vielmehr eine Induktion, die nicht durch die Anwesenheit oxydabler Substanzen, sondern durch spezifische Eingriffe in den Stoffwechsel verursacht wird.

Durch Toluol hervorgerufene Autolyse ergab keine Laccase-Ausscheidung. Daraus ist zu schließen, daß ohne induktiven Eingriff Laccase in dem jungen, wachsenden Mycel nicht vorhanden ist. Peroxydase wird von dem Pilz nicht gebildet (LYR 1958).

Tabelle 2. *Wirkung von aromatischen Säuren auf die Laccase-Induktion*

Substanzen	Wachstums-hemmung	Induktion	Substanzen	Wachstums-hemmung	Induktion
Benzoessäure	++	0	K-Naphthyl-essigsäure	+	0
p-Chloro-mercuri-benzoat	++	++	Amino-Naphthyl-		
Salicylsäure	++	0	sulfonsäure	0	0
Pikrinsäure	++	0	Gallussäure ¹	(+)	0
p-Aminobenzoessäure . .	0	0	Gallussäure, voroxyd. .	0	(+)?
o-Aminobenzoessäure ¹ .	++	0	Tannin ¹	+	++
β -Indolylessigsäure ¹ . .	+	0	2,4-Dichlorphenoxy-		
Trichlorphenoxyessig-			essigsäures-Na	+	0
säure	0	0			

¹ Wird oxydiert.

Tabelle 3. *Wirkung von Aminosäuren und von Allantoin auf die Laccase-Induktion*

Substanzen	Wachstums-hemmung	Induktion	Substanzen	Wachstums-hemmung	Induktion
Asparagin	0	0	Alanin	0	0
Glutamin	0	0	Glykokoll	0	0
Tryptophan	0	0	Methionin	0	0
Tyrosin	0	0	Allantoin	0	0

Tabelle 4. *Wirkung von Phenolderivaten und anderen Verbindungen auf die Laccase-Induktion*

Substanzen	Wachstums-hemmung	Induktion	Substanzen	Wachstums-hemmung	Induktion
Pentachlorphenol . . .	+++	+++	o-Tolidin ¹	0	0
2,4-Dinitrophenol . . .	+++	0+	o-Anisidin ¹	+	+
2,6-Dinitro-o-kresol . .	++	++	α -Naphthylamin ¹ . .	+++	0
Brenzcatechin ¹	++	0++	β -Naphthylamin . . .	0	0
Pyrogallol ¹	++	0+	Indol	+	0
Guajacol ¹	++	0	Inositol	0	0
β -Naphthol ¹	++	0	Coffein	(+)	0
p-Tolidin ¹	+	0	Hydrochinon ¹	++	0
o-Tolidin	+	0	Chinhydron ¹	+	0

¹ wird oxydiert.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß sich Gallussäure als unwirksam für eine Induktion erwies, während Tannin eine kräftige Enzyymbildung hervorrief (Abb. 1). Daraus ist zu erkennen, daß beide Verbindungen

physiologisch nicht gleichwertig sind. Aus diesem Grunde wurde für die praktische Verwendung zum Oxydasen-Nachweis mit der BAVENDAMM-Reaktion Tannin bevorzugt (LYR 1958), um alle induzierbaren Laccase-Bildner zu erfassen.

Tabelle 5. Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf die Laccase-Induktion

Substanzen	Wachstums- hem- mung	Induk- tion	Substanzen	Wachstums- hem- mung	Induk- tion
HgCl ₂	+++	0	Phloridzin ¹	+	0
NaF	+++	0	Cumarin	+	0
Na-Arsenit	++	0	Thioharnstoff	+	+
Na-Arsenat	+	0			

¹ schwer löslich.

Enzymatisch oxydierte oder autoxydierte Gallussäure hat anscheinend ebenfalls eine schwach induzierende Wirkung, die aber nicht so deutlich und kräftig ist wie die des Tannins. Offenbar sind die Oxydations- oder die Intermediärprodukte der Oxydation für die Wirkung verantwortlich. Handelsübliches Tannin stellt keine rein galloylierte Glucose dar, sondern ist bereits in mehr oder weniger starkem Maße oxydiert, was an der

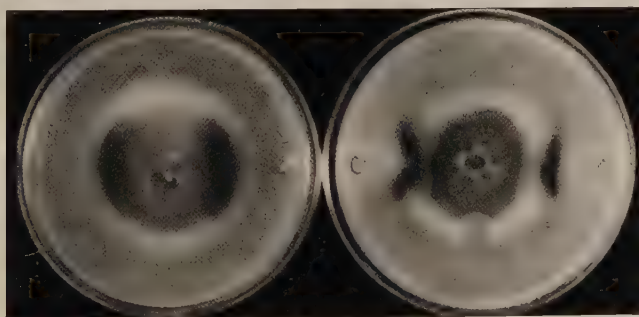


Abb. 1. Wirkung von Gallussäure und Tannin auf die Laccase-Induktion von *C. velutipes* (α -Naphthol-Malz-Agar-Schalenunterseite); links Gallussäure (keine Induktion, aber deutliche Oxydation am zentralen Laccase-Kern); rechts Tannin (Laccase-Induktion beim Zusammentreffen mit dem Mycel)

braunen Färbung der Lösung und an der Neigung zur Hydroperoxyd-bildung zu erkennen ist. Die physiologischen Hintergründe dieses Phänomens sind vorläufig noch unklar und bedürfen eines weiteren Studiums. Erwähnt werden muß, daß bereits LINDEBERG (1949) auf die unterschiedliche Wirkung von oxydierter und nicht oxydierter Gallussäure hingewiesen hat. Auch gegenüber anderen Pilzen zeigte Tannin die gleiche kräftige Induktionswirkung, so daß das Verhalten von *Collybia velutipes* keinen Sonderfall darstellt. Die inkonstante Wirkung von Pyrogallol und

Brenzcatechin ist eventuell ebenfalls durch die Aktivität von Oxydationsprodukten zu erklären, da bekanntlich beide Substanzen sehr leicht antoxydabel sind. Auf diese Weise lassen sich vermutlich auch die Ergebnisse von FÄHRAEUS (1953) deuten, der eine größere Zahl von Phenolderivaten — darunter auch Gallussäure — als induktionskräftig gegenüber *Polyporus versicolor* fand. Spezielle Untersuchungen über dieses Problem sind noch in Vorbereitung.

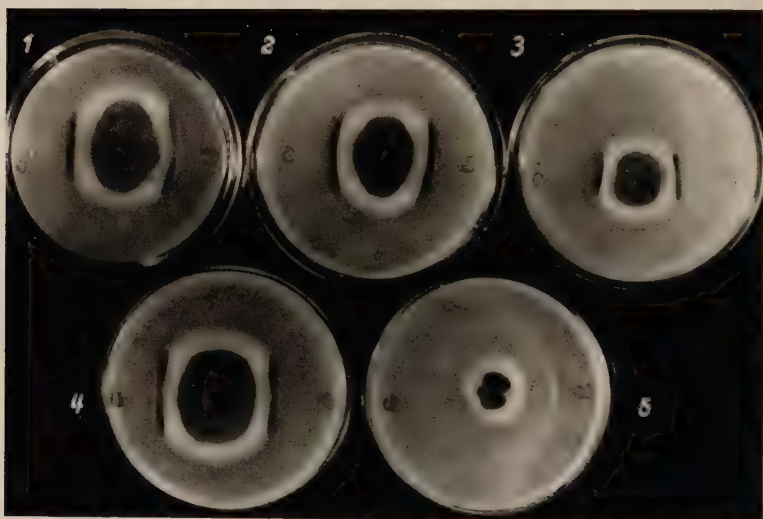


Abb. 2. Laccase-Induktion durch verschiedene organische Säuren. 1 Citronensäure, 2 Bernsteinsäure, 3 Fumarsäure, 4 Äpfelsäure, 5 Essigsäure

Es fällt auf, daß viele wirksame organische Säuren dem Citronensäure-Cyclus angehören (Abb. 2). Nur Oxalessigsäure zeigte sich völlig unwirksam, während α -Ketoglutarsäure schwach aktiv war. Die Salze der induktionskräftigen Säuren erwiesen sich alle als unwirksam und riefen auch kaum eine Hemmung des Mycelwachstums hervor, was durch mangelnde Permeation zu erklären sein dürfte. Diese Tatsache erschwert es, zwischen einer H-Ionen-Wirkung und einer spezifischen Wirkung des Säure-Anions zu unterscheiden. Da jedoch Eisessig, H_2SO_4 und H_3PO_4 zwar eine starke Wuchshemmung hervorriefen, aber keine oder nur eine sehr inkonstante Laccase-Bildung bewirkten, neige ich zu der Auffassung, daß den aktiven Säuren eine spezifische Induktionswirkung zuzuschreiben ist, die bei den meisten mit ihrer Funktion im Citronensäurecyclus zusammenhängen dürfte.

Sämtliche untersuchten Aminosäuren erwiesen sich — allein geboten — als induktionsunwirksam. Das scheint in einem gewissen Widerspruch zu den Ergebnissen von FÄHRAEUS u. LINDBERG (1953) zu stehen, die

eine Förderung der Laccase-Produktion von *Polyporus zonatus* und *P. versicolor* durch Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin feststellen konnten. Hierbei ist jedoch nicht zu vergessen, daß es sich bei diesen Pilzen nur um eine Steigerung der Laccase-Bildung handelt, da sie auch ohne Zusätze bereits Laccase bilden.

Das gilt auch für die unterschiedlichen Ergebnisse, die FÄHRAEUS u. TULLANDER (1956) bei *Polyporus versicolor* und *Marasmius scorodonius* erhalten haben. Dort erwiesen sich o-Toluidin, o-Aminophenol, o-Anisidin, 8-Hydroxychinolin, Guajacol, 2-Naphthylamin und β -Indolylessigsäure als sehr aktiv, während in den hier beschriebenen Versuchen diese Substanzen völlig unwirksam waren, wobei höchstens o-Anisidin eine Ausnahme macht. Dennoch brauchen die unterschiedlichen Ergebnisse keinen Widerspruch zu bedeuten, da es sich bei den untersuchten Pilzen um sehr verschiedenartige Typen handelt. Zweifellos wird bei den Pilzen, die auch normalerweise bereits Laccase bilden, eine Induktion auch mit weniger wirksamen Substanzen zu erreichen sein, da es offenbar nur eines geringeren Anstoßes bedarf, um eine bereits vorhandene Laccase-Produktion noch zu steigern. Das zeigt sich auch darin, daß die von FÄHRAEUS u. TULLANDER benutzten Substanzen in den gewählten Konzentrationen keinen wesentlichen Einfluß auf das Wachstum ausüben, wie aus den Werten für das Myceltrockengewicht zu entnehmen ist. Bei *Collybia velutipes* ist dagegen ein stärkerer Eingriff erforderlich, um den Stoffwechsel in Richtung Laccase-Bildung „umschalten“. Fast stets ist damit eine Wachstums- hemmung verbunden. Außerdem muß erwähnt werden, daß bei der von den schwedischen Autoren gewählten Methode in einigen Fällen ebenso wie bei FÄHRAEUS (1953) eine Induktionswirkung durch Oxydationsprodukte der zugesetzten Substanzen nicht auszuschließen ist, da die Kontrollen teilweise bereits Laccase aufwiesen.

Die Verhältnisse bei *Collybia velutipes* geben die Möglichkeit, nur die Substanzen mit besonders aktiver Induktionswirkung zu erfassen.

Es darf hierbei jedoch nicht unerwähnt bleiben, daß die Laccase-Bildung bei *Collybia velutipes* nicht nur unter so starken und unphysiologischen Eingriffen einsetzt, wie sie bisher beschrieben wurden. Oftmals scheidet bereits das aufgetragene Impfstück Laccase aus, deren Bildung manchmal beibehalten, in den meisten Fällen aber nach Auswachsen der Hyphen eingestellt wird. Auch das auf der Testplatte normal wachsende Mycel beginnt nach einiger Zeit in seinem Zentrum um die Impfstelle Laccase auszuscheiden, so daß im Zentrum der Kultur ein „Laccase-Kern“ entsteht, der sich mit fortschreitendem Wachstum vergrößert (vgl. Abb. 1). Sobald oxydable Substanzen auf diesen „Laccase-Kern“ stoßen, werden sie oxydiert, wie es am Beispiel der Gallussäure (Abb. 1) deutlich sichtbar ist. Die Bildung dieses Laccase-Zentrums kann durch Erhöhung der Malz-Konzentration eingeschränkt werden und ist wahrscheinlich durch auftretenden Nährstoffmangel bedingt. Es zeigt sich nämlich, daß der Pilz zur Laccase-Produktion übergeht, wenn das Mycel auf ein nährstoffarmes Medium trifft (Abb. 3). Zweifellos ist diese Tatsache auch von ökologischer Bedeutung.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß bestimmte Mikroorganismen ebenfalls die Laccase-Bildung induzieren können (Abb. 4).

Wie aus Tab. 6 zu ersehen ist, sind hierzu sowohl einige Pilze als auch verschiedene Bakterien befähigt. Die Enzyminduktion erwies sich als unabhängig von der Wachstumsbeeinflussung und nur auf bestimmte Arten beschränkt. Als Ursachen für die Laccase-Bildung kommen nach den bisherigen Untersuchungen folgende Möglichkeiten in Betracht: 1. Durch das Wachstum der Mikroorganismen entsteht eine Nahrungsmangelzone, die die Enzymbildung induziert. 2. Die Mikroorganismen bilden organische Säuren, von denen besonders die des Citronensäurecyclus sich als sehr

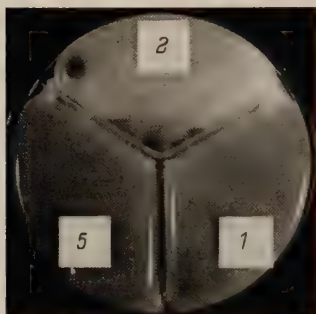


Abb. 3

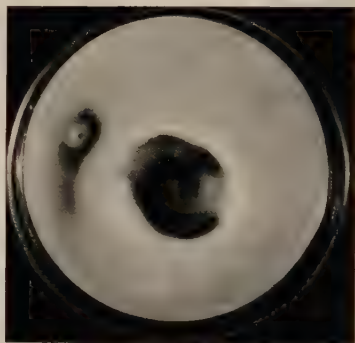


Abb. 4

Abb. 3. Laccase-Bildung beim Hinüberwachsen auf ein nährstoffarmes Medium. 1 α -Naphthol-Malzalagar (keine Laccase), 2 gleiches Medium aber ohne Malz (Laccase-Ausscheidung beim Hinüberwachsen des Mycels), 5 Malz-Agar

Abb. 4. Laccase-Induktion durch *Pseudomonas fluorescens*. (α -Naphthol-Malz-Agar, Schalenunterseite)

aktiv erwiesen haben. 3. Es werden spezifische Antibiotica ausgeschieden, die ebenso wie die anderen aktiven Hemmstoffe eine Fermentbildung in spezifischer Weise induzieren. Keine der Erklärungsmöglichkeiten ist allein voll befriedigend. Gegen 1. spricht die Tatsache, daß das Induktionsvermögen auf einige Arten beschränkt ist und andere Arten mit hoher Stoffwechselintensität inaktiv bleiben. Gleiches trifft auch für 2. zu, wobei hinzukommt, daß bei den Bakterien kaum mit einer so intensiven Säurebildung gerechnet werden kann, wie sie für eine Induktion erforderlich wäre. Dagegen spricht manches für 3., weil dadurch die artspezifische Aktivität erklärt würde. Im Widerspruch hierzu steht nur die Tatsache, daß das Wachstum von *C. velutipes* durch *Bac. vulgaris* und *Bac. mesentericus* gefördert wird bei gleichzeitiger Laccase-Induktion. Vermutlich handelt es sich um eine komplexe Wirkung der genannten sowie noch unbekannter Faktoren.

In weiteren Versuchen wurde die Wirkung definierter chemischer Stoffe auf das Pilzwachstum und die Enzymbildung untersucht. Besonders geeignet erschien hierfür *Pentachlorphenol* (PCP), das sich als sehr aktiv

für die Induktion erwiesen hatte (Abb. 5). Vor allem kam es darauf an, den zeitlichen Verlauf dieses Vorganges und die Zusammenhänge zwischen Induktion und Wachstumshemmung kennenzulernen.

Tabelle 6. Wirkung verschiedener Mikroorganismen auf Wachstum und Laccase-Induktion bei *Collybia velutipes*

Mikroorganismen	Wachstum		Laccase-Induktion
	gehemmt	gefördert	
<i>Bacillus cereus</i> Fr. et Fr.	0	0	(+)
<i>Bacillus subtilis</i> Cohn	0	0	0
<i>Bacillus mycoides</i> Flügge	0	0	(+)
<i>Bacillus mesentericus</i> Flügge	0	+++	++
<i>Bacillus spec. (vulgatus)</i>	0	+	++
<i>Aerobacter aerogenes</i> Beij.	0	0	0
<i>Alcaligenes faecalis</i> Cast. et Chal	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> Cast. et Chal.	0	0	0
<i>Proteus vulgaris</i> Hauser	0	0	0
<i>Rhizobium leguminosarum</i> Frank	0	0	0
<i>Micrococcus pyogenes aureus</i> Zopf	0	0	+
<i>Micrococcus roseus</i> Flügge	0	0	0
<i>Bacterium prodigiosum</i> Ehrenb.	0	0	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Mig.	+	0	+++
<i>Pseudomonas spec.</i>	+	0	++
<i>Aspergillus flavus</i> Link	+	0	++
<i>Aspergillus flavescens</i> Wred.	++	0	++
<i>Aspergillus glaucus</i> L.	+	0	++
<i>Aspergillus ochraceus</i> Wilh.	+	0	0
<i>Aspergillus oryzae</i> Cohn	(+)	0	0
<i>Penicillium camemberti</i> Thom	+	0	0
<i>Penicillium claviforme</i> Bainier	++	0	0
<i>Penicillium glaucum</i> Link	+	0	+
<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierck	++	0	(+)
<i>Penicillium luteum</i> Zukal	+	0	+
<i>Penicillium notatum</i> Westl.	0	0	0
<i>Penicillium roqueforti</i> Thom	++	0	(+)
<i>Penicillium brevicaulis</i> Sacc.	(+)	0	++
<i>Penicillium spec. (Luftkeim)</i>	0	++	++

Für diesen Zweck wurden Flüssigkeitskulturen von *C. velutipes* in 3% iger Malzlösung benutzt. 100 ml Erlenmeyer-Kolben wurden mit je 25 ml Malzlösung beschickt, in üblicher Weise im Dampftopf sterilisiert und mit einer Mycelaufschwemmung des Pilzes beimpft. Die Kulturen standen in einem thermokonstanten Raum bei 25° C und schwacher Beleuchtung. Nach 21 Tagen wurden je Kolben 5 ml Induktionslösung zugesetzt, die Kontrollen erhielten die gleiche Menge Wasser. Der pH-Wert aller zugesetzten Lösungen war vorher auf 4,6 eingestellt worden. Für die Bestimmung jedes Einzelwertes wurden jeweils 6 Kolben verwendet, die in Abständen von 3, 6, 9, 12 und 14 Tagen nach der Induktion zur Auswertung kamen. Die in den Abb. 6—12 wiedergegebenen Werte sind die Ergebnisse zweier Versuchsreihen. Die Feststellung der Trockensubstanz (TS) an Pilzmycel erfolgte nach

Trocknung bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz. Die TS ist in mg/Kolben angegeben. Der pH-Wert der Kulturfiltrate wurde mit der Glaselektrode gemessen.

Für die Messung der Laccase-Aktivität benutzte ich ein Verfahren in Anlehnung an den BAS-Test für Peroxydase (LYR 1957), das zwar für Laccase nicht so exakte Werte wie für Peroxydase gibt, aber — wie Vergleiche zeigten — der manometrischen Methode an Genauigkeit nicht nachsteht und überdies den Vorteil besitzt, einen geringeren Zeitaufwand zu erfordern. Die Empfindlichkeit ist bei geringen Fermentkonzentrationen größer als bei der manometrischen Methode. Ähnlich wie beim BAS-Test werden 1 ml Benzidin (0,02% in Acetat-Puffer von pH 4,7 gelöst), 1 ml Ascorbinsäure bekannter Konzentration und 1 ml Enzymlösung (Kulturfiltrat

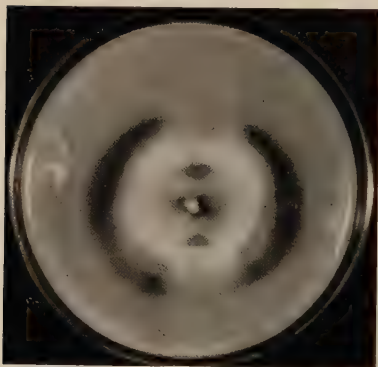


Abb. 5.
Laccase-Induktion durch Pentachlorphenol
(α -Naphthol-Malz-Agar, Schalenunterseite)

aus reaktionskinetischen Gründen noch zu hoch, erhöht aber die Empfindlichkeit des Testes, ohne die Aussagefähigkeit bei vergleichenden Messungen an einem Enzym einzuschränken. Die Aktivitätswerte sind in mg umgesetzter AS/sec angegeben und beziehen sich jeweils auf die Aktivität von 1 ml Kulturfiltrat.

Außer der Wirkung des Pentachlorphenols interessierte auch der Einfluß des C:N-Verhältnisses auf die Laccase-Bildung. Deshalb wurden neben dem Pentachlorphenol sowohl getrennt als auch gleichzeitig Glucose und Asparagin in abgestuften Konzentrationen zugesetzt. Die zugegebenen Mengen sind in den Texten der Abbildungen als Endkonzentrationen in der Kulturflüssigkeit angegeben.

In den Abb. 6—8 sind zunächst die Wirkungen der Zusätze von Pentachlorphenol allein und in Kombination mit Asparagin dargestellt. Bei den TS-Kurven fällt auf, daß bei allen Pentachlorphenol-Zusätzen bis zu $2 \cdot 10^{-7}$ mol eine deutliche und bei höheren Konzentrationen sogar eine starke Abnahme der TS gegenüber den Kontrollen (gestrichelte Linie) zu beobachten ist (Abb. 6). Das Maximum der Wirkung liegt bei $2 \cdot 10^{-4}$ mol bei 9 Tagen. Dieser relativ langsam einsetzende Effekt ist wahrscheinlich durch die langsame Permeation von PCP bei dem pH-Wert von 4,7—5,4 der Kulturflüssigkeit zu erklären. Worauf die starke Abnahme der TS

gemischt, die Mischung wird mit reinem Sauerstoff durchströmt. Die Zeit bis zum Auftreten des Farbumschlages (Oxydation der vorgelegten Ascorbinsäuremenge [AS]) wird mit Stoppuhren bestimmt. 5 Einzelmessungen ergeben einen Mittelwert. Im Gegensatz zum BAS-Test sind bei Laccase die Umsatzzeiten bei verlängerter Reaktionszeit gegenüber den theoretischen Werten verkürzt, wodurch eine engere Begrenzung des Zeitintervalls für die Messung erforderlich ist. Die Reaktionszeiten sollten so gewählt werden, daß sie zwischen 60 und 90 sec liegen. Die Ursachen dieses Phänomens, das bei Fermentpräparaten von verschiedener Herkunft und Reinheitsgrad beobachtet wurde, sind zur Zeit noch ungeklärt. Die gewählte Benzidinkonzentration ist an sich für vergleichende Messungen an verschiedenen Fermenten

beruht, soll noch eingehender untersucht werden. Es könnte sich um eine „Entkoppelung“ des Stoffwechsels handeln, wofür manches spricht. Durch eingeschränkte Synthesen und vermehrten Abbau müßte es zu einem Substanzverlust kommen. In welchem Ausmaß bei den angewendeten Konzentrationen die Atmung beeinflußt wird, wurde noch nicht geprüft. Außerdem ist auch eine Änderung der Permeabilität unter dem Gifteinfluß denkbar. 2,4-Dinitrophenol und 2,6-Dinitro-o-Kresol sowie Toluol rufen ebenfalls eine starke TS-Abnahme hervor, wobei Toluol aber keine Induktionswirkung hat. Abb. 7 zeigt ebenfalls die Wirkung von PCP, jedoch bei gleichzeitigem Zusatz von Asparagin. Im Prinzip ist der Kurvenverlauf gleich, aber der Abfall der TS-Werte ist weniger stark ausgeprägt und die PCP-Vergiftung deutlich gemildert. Bei $2 \cdot 10^{-7}$ mol PCP liegen die TS-Werte sogar über den Kontrollen. Hierfür gibt es unter den gewählten Versuchsbedingungen zwei Erklärungs-möglichkeiten.

Einmal könnte Asparagin den Stoffwechsel vor der PCP-Wirkung schützen bzw. durch ein erhöhtes Stickstoffangebot die Schädigung mindern. Zum anderen Male steigen durch

den Asparagin-Zusatz — vermutlich infolge von Desaminierungen — nach 9 Tagen die p_H -Werte bis zu p_H 7,2 und sogar bis 8,2 an, wodurch die Permeabilität für PCP verringert wird. Im Hinblick auf den Einfluß von

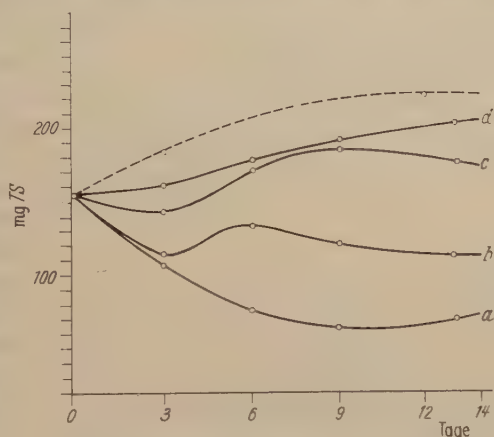


Abb. 6. Wirkung verschiedener Konzentrationen von Pentachlorphenol auf die Trockensubstanzbildung. PCP-Endkonzentrationen in der Kulturflüssigkeit: a $2 \cdot 10^{-4}$ mol, b $2 \cdot 10^{-5}$ mol, c $2 \cdot 10^{-6}$ mol, d $2 \cdot 10^{-7}$ mol; Gestrichelte Linie: Kontrolle

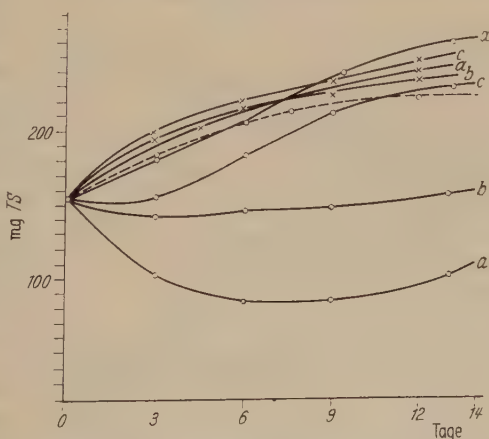


Abb. 7. Wirkung von PCP + Asparagin und Asparagin-Zusatz auf die Trockensubstanzbildung. o—o—o PCP in steigenden Konzentrationen (wie Abb. 6) + 0,8% Asparagin. x—x—x Asparagin. a 0,8%, b 0,2%, c 0,05%

Asparagin auf die Laccase-Bildung ist aber anzunehmen, daß Asparagin eine spezifische Wirkung besitzt, zumal die pH -Werte erst nach 9 Tagen ansteigen, eine deutliche Schutzwirkung aber bereits vorher festzustellen

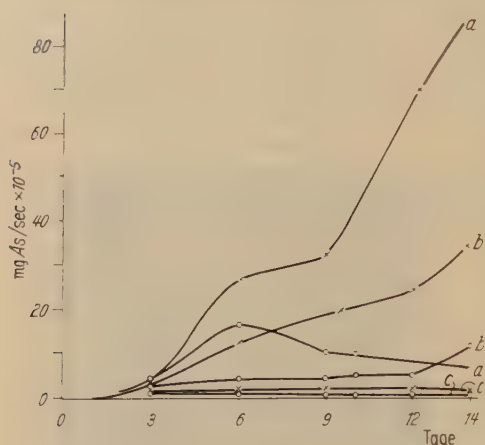


Abb. 8. Laccase-Induktion durch PCP und PCP + Asparagin-Zusatz. $\circ-\circ$ PCP (siehe Abb. 6), $\times-\times-\times$ PCP (siehe Abb. 6) + 0,2% Asparagin

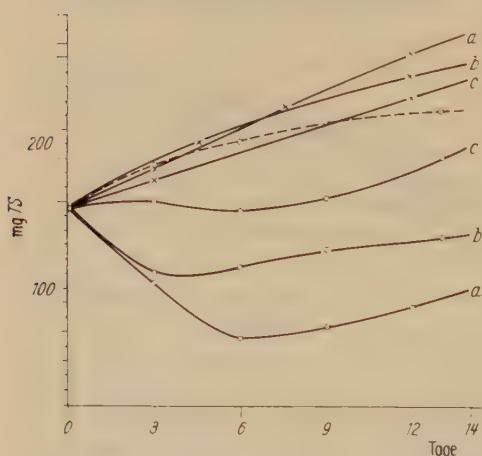


Abb. 9. Wirkung von Glucose und PCP + Glucose-Zusatz auf die Trockensubstanzbildung. $\circ-\circ$ PCP (Konz. wie im Text zu Abb. 6 angegeben) + 0,4% Glucose, $\times-\times-\times$ a 0,8%, b 0,2%, c 0,05% Glucose

sachten TS-Abfall nicht zu beeinflussen. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Asparagin ist wiederum eine deutliche Abschwächung der PCP-Ver-

giftung festzustellen, wie sie bereits in Abb. 7 zum Ausdruck kam. Die ist. Ein Zusatz von Asparagin allein erhöht die TS-Zunahme geringfügig, führt aber zu keiner Laccase-Induktion. Im Abb. 8 ist der Verlauf der Laccase-Ausscheidung unter dem Einfluß von PCP allein und mit einem Zusatz von Asparagin angegeben. Auch PCP allein bewirkt bereits eine Laccase-Bildung, die nur bei Konzentrationen von $2 \cdot 10^{-4}$ mol sehr ausgeprägt ist und nach 6 Tagen ihr Maximum erreicht. Gleichzeitiger Zusatz von Asparagin hingegen führt zu einer kräftigen und anhaltenden Enzym-Synthese auch bei niedrigeren PCP-Konzentrationen. Hieraus ist ersichtlich, daß Asparagin die Laccase-Bildung zwar nicht induzieren, aber doch sehr stark fördern kann. Möglicherweise sind auch andere Aminosäuren hierzu in der Lage, wodurch die Befunde von FAHRÆUS u. LINDBERG (1953) bestätigt würden.

Die Abb. 9—12 veranschaulichen den Einfluß von Glucose auf die TS-Bildung bei gleichzeitigem Zusatz von PCP allein und in Kombination mit Asparagin. Glucose allein erhöht die TS-Bildung mit steigender Konzentration (Abb. 9), vermag aber den durch PCP verur-

„Entgiftung“ ist bei $2 \cdot 10^{-5}$ mol PCP nachhaltiger als mit Asparagin allein, was man eventuell einer allgemeinen Intensivierung des Stoffwechsels zuschreiben könnte, da auch die TS-Zunahme bei Glucose + Asparagin-Zusatz die höchsten Werte erreicht (Abb. 10).

Auf die Induktion der Laccase-Bildung hat der Glucose-Zusatz nach Abb. 11 keinen deutlichen Einfluß, da der Kurvenverlauf im Prinzip der gleiche wie in Abb. 8 ist. Nur eine Abschwächung der Asparagin-Wirkung bei hoher PCP-Konzentration erscheint möglich. Um diese Wirkung zu klären, wurde in einem weiteren Versuch die Glucose-Konzentration variiert (Abb. 12). Dabei zeigt sich, daß steigende Glucose-Mengen einen leicht depressiven Einfluß auf die Laccase-Induktion durch PCP + Asparagin ausüben, was vom 9. Tag an deutlich wird. Der Glucose-Effekt ist zwar gering, in seiner Wirkung aber dem Asparagin-Einfluß entgegengesetzt.

Weitere Versuche mit Flüssigkeitskulturen ergaben, daß sich die induzierte Laccase-Synthese durch 2,4-Dinitrophenol nicht hemmen läßt, sondern daß auch 2,4-Dinitrophenol eine Laccase-Induktion bewirkt, die allerdings geringer ist als die durch PCP. Im Platten-

test hatte sich eine Induktionswirkung durch diese Verbindung nicht immer nachweisen lassen, vermutlich weil durch die gute Löslichkeit dieser Substanz sehr rasch toxische Konzentrationen erreicht wurden.

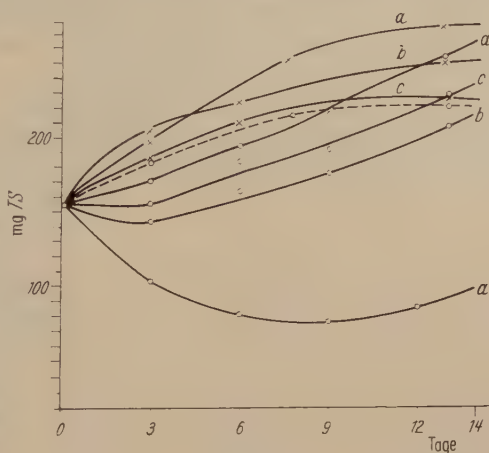


Abb. 10. Wirkung von Asparagin + Glucose und PCP + Asparagin + Glucose auf die Trockensubstanzbildung. $\circ-\circ-\circ$ PCP (siehe Abb. 6) + 0,2% Asparagin + 0,2% Glucose. $\times-\times-\times$ 0,8% Asparagin + a 0,8%, b 0,2%, c 0,05% Glucose

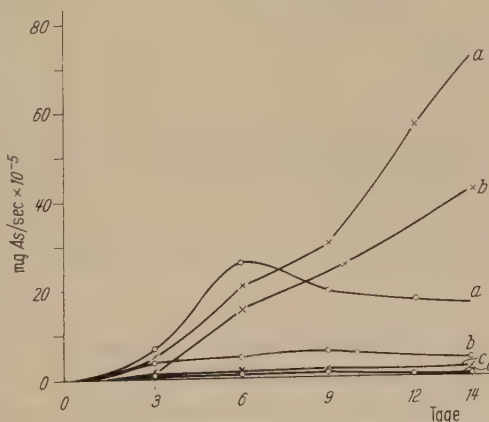


Abb. 11. Laccase-Induktion durch Zusatz von PCP + 0,4% Glucose ($\circ-\circ-\circ$) und PCP + 0,2% Asparagin + 0,2% Glucose ($\times-\times-\times$). (PCP-Konzentrationen wie bei Abb. 6 angegeben)

Auch 2,6-Dinitro-o-kresol gab in Flüssigkeitskulturen eine Laccase-Bildung, die ebenso wie bei PCP durch Asparagin gefördert wurde. Allerdings war der Gesamteffekt geringer.

Versuche mit synthetischer Nährlösung führten zu grundsätzlich gleichen Ergebnissen, allerdings waren Mycel- und Enzymausbeute geringer.

Diskussion

Wenn auch die vorliegenden Ergebnisse noch nicht ausreichen, um das Phänomen der Laccase-Induktion zu erklären, so ergeben sich doch

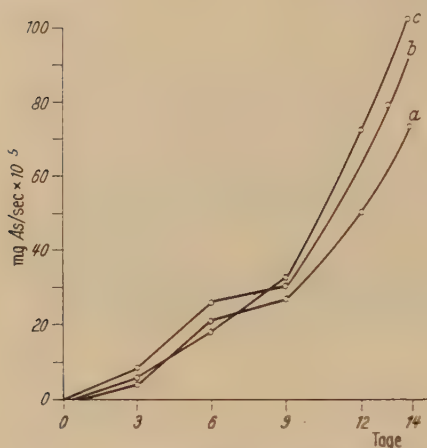


Abb. 12. Wirkung steigender Glucose-Zusätze auf die Laccase-Induktion durch $2 \cdot 10^{-4}$ mol PCP — 0,8% Asparagin.

a 0,8%, b 0,2%, c 0,05% Glucose

einige Gesichtspunkte, die einer Erörterung wert erscheinen. Bei oberflächlicher Betrachtung lassen die induktionskräftigen Substanzen zunächst keine Beziehung untereinander erkennen. Strukturell sind sie völlig verschieden, so daß ihre Aktivität nicht auf analogem strukturellem Aufbau beruhen kann. Auch ihre physiologische Bedeutung ist so verschieden, daß mit einem Angriff an verschiedenem Stellen im Stoffwechsel zu rechnen ist. Es fällt aber auf, daß unter den aktiven Substanzen Chemikalien mit spezifischer physiologischer Wirkung zahlreich vertreten sind. Mit einigen Ausnahmen lassen sich die Verbindungen in folgende Gruppen einordnen:

1. Hemmstoffe der oxydativen Phosphorylierung (substituierte Phenole).
2. SH-Gruppen Gifte (p-Chlor-Mercuribenzoat, Mono-Jodessigsäure sowie eventuell Tannin und Oxydationsprodukte von Polyphenolen).
3. Säuren des Citronensäurecyclus.
4. Hemmstoffe des Citronensäurecyclus (Malonsäure in geringerer Konzentration, aber nicht Fluoressigsäure).

Diese Zusammenstellung läßt erkennen, daß die Laccase-Synthese vermutlich mit der Funktion des Citronensäurecyclus zusammenhängt. Es ist bekannt, daß zahlreiche Synthesen vom Citronensäurecyclus ausgehen können. Offenbar bewirkt eine Behinderung der ableitenden Wege des Cyclus, wie sie durch SH-Gruppen Gifte oder substituierte Phenole eintreten kann, eine gesteigerte Laccase-Synthese, weil dadurch der Stoffwechsel in andere Bahnen gelenkt wird. Auch die Wirkung der Malon-

säure und der substituierten Phenole könnte so gedeutet werden. Möglicherweise spielt dabei auch die Anreicherung von Intermediärprodukten eine Rolle, was die Wirksamkeit der Säuren des Citronensäurecyclus erklären würde. Eine völlige Unterbrechung des Citronensäurecyclus durch Fluoressigsäure oder höhere Konzentrationen von Malonsäure führt nicht zu einer Enzyminduktion, was die Bedeutung des Cyclus für die Synthese unterstreicht. Es ist verständlich, daß ein so komplexer Prozeß von verschiedenen Seiten aus beeinflußbar ist. Leider ist über die Struktur des Laccase-Moleküls bisher nichts Sicheres bekannt, so daß man keine Anhaltspunkte bei Synthesen analoger Verbindungen suchen kann. Eine ausführlichere Diskussion ist daher erst nach dem Vorliegen weiterer Ergebnisse sinnvoll.

Bemerkenswert ist die Wirkung von Pentachlorphenol, über dessen physiologischen Angriffspunkte bisher wenig bekannt ist, obwohl es eines der wichtigsten Holzschutzmittel darstellt. HIGUCHI u. Mitarb. (1953) konnten eine Hemmung der Dehydrierung von Succinat zu Fumarat unter dem Einfluß von PCP feststellen. WEINBACH u. NOLAN (1956) schreiben dem PCP eine Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung zu. Sie konnten unter der Gifteinwirkung eine starke Zunahme der Glykolyse in lebenden Schnecken beobachten.

Diese Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen, die auch für eine derartige Wirkung sprechen, da andere als Entkoppelungsgifte bekannte Verbindungen sich ebenfalls als induktionskräftig erwiesen haben. Es liegt hier der merkwürdige Fall vor, daß eine Synthese durch die Hemmung der oxydativen Phosphorylierung gefördert wird, was der üblichen Auffassung von der „Entkoppelung“ des Stoffwechsels zu widersprechen scheint. Es ist aber durchaus möglich, daß ein solcher Fall eintreten kann, wenn besondere Bedingungen gegeben sind, unter denen die Anhäufung von Intermediärprodukten sicher eine wichtige Rolle spielt. Weitere Untersuchungen sind bereits eingeleitet, um die Wirkung von Pentachlorphenol auf den Pilzstoffwechsel eingehender zu studieren.

Zusammenfassung

1. Junges Mycel von *Collybia velutipes* bildet bei normalem Wachstum auf geeigneten Nährmedien keine Laccase. Die Enzymsynthese kann jedoch durch die Einwirkung verschiedener Chemikalien, durch bestimmte Mikroorganismen sowie durch Nährstoffmangel induziert werden.
2. Es handelt sich um eine echte Induktion und nicht um eine adaptive Fermentbildung oder um Freisetzung intracellulärer Laccase.
3. Als besonders induktionskräftig hat sich Pentachlorphenol erwiesen. Seine Wirkung in wechselnden Kombinationen mit Asparagin und Glucose

auf die Trockensubstanzproduktion und die Laccase-Synthese wurde quantitativ verfolgt.

4. Die Laccase-Bildung läßt sich durch Asparagin nicht induzieren, wohl aber nachhaltig fördern, während Glucose eine schwach depressive Wirkung auf die Enzym-Ausscheidung hat.

5. Aus den als induktionswirksam befundenen Substanzen wird an eine Beteiligung des Citronensäurecyclus an der Laccase-Synthese geschlossen.

Für die umsichtige Hilfe bei der Durchführung der Versuche danke ich besonders Frl. CHRISTEL HEFFE, ebenso Frau CH. SCHÄGE für die Betreuung der Pilzkulturen.

Literatur

- BOIDIN, J.: Recherche de la tyrosinase et de la laccase chez les Basidiomycètes en culture pure. Milieux différentiels. Intérêt systématique. *Revue Mycol.* **16**, 173 (1951). — FÄHRAEUS, G.: Formation of laccase by *Polyporus versicolor* in different culture media. *Physiol. Plantarum* **5**, 284 (1952). — Induction of laccase formation in *Polyporus versicolor*. *Atti del VI Congresso internazionale di microbiologia* **5**, Sez. XIV, 130 (1953). — FÄHRAEUS, G., and G. LINDBERG: Influence of tyrosine and some other substances on the laccase formation in *Polyporus* species. *Physiol. Plantarum* **6**, 150 (1953). — FÄHRAEUS, G., and V. TULLANDER: Effect of indole-3-acetic acid on the formation of oxidases in fungi. *Physiol. Plantarum* **9**, 494 (1956). — HIGUCHI, T., and K. KITAMURA: Biochemical study of wood-rotting fungi II. Relation between BAVENDAMM's reaction and tyrosinase. *J. Japanese Forestry Soc.* **35**, 350 (1953). — HIGUCHI, T., M. WATANABE and H. TAMURA: Studies on the effect of sodium pentachlorophenate on the metabolism of some wood rotting fungi. *J. Japanese Forestry Soc.* **35**, 1 (1953). — LINDBERG, G.: Influence of enzymatically oxidized gallic acid on the growth of some hymenomycetes. *Sv. bot. Tidskr.* **43**, 438 (1949). — LINDBERG, G., and G. HOLM: Occurrence of tyrosinase and laccase in fruit bodies and mycelia of some hymenomycetes. *Physiol. Plantarum* **5**, 100 (1952). — LYR, H.: Untersuchungen über die Peroxydasen höherer Pilze. *Planta (Berl.)* **48**, 239 (1956). — Ein neues Peroxydase-Bestimmungsverfahren. *Biochem. Z.* **329**, 91 (1957). — Über den Nachweis von Oxydasen und Peroxydasen bei höheren Pilzen und die Bedeutung dieser Enzyme für die BAVENDAMM-Reaktion. *Planta (Berl.)* **50**, 359 (1958). — WEINBACH, E., and M. NOLAN: The effect of pentachlorophenol on the metabolism of the snail *Australorbis glabratus*. *Exper. Parasitol.* (New York) **5**, 276 (1956).

(Aus dem Forstbotanischen Institut der Universität Freiburg)

Untersuchungen über das Atmungsverhalten von Hefen

II. Die Bedeutung der Zuckerkonzentration*

Von

ETTA GREVE

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. August 1957)

Bei unseren Versuchen, den Energiestoffwechsel gärender Hefen möglichst nachdrücklich auf Atmung umzuschalten, haben wir in einer vorhergehenden Arbeit (GREVE 1957) die Wirkung von Sauerstoffatmosphäre analysiert. Bei den Untersuchungen, die in der vorliegenden Veröffentlichung besprochen werden sollen, handelt es sich darum, unter Ausnutzung der Erfahrungen, die zahlreiche Autoren (MEYERHOF u. IWA-SAKI 1930, GEIGER-HUBER 1935, HOPKINS u. ROBERTS 1935, COMMONER 1939, ALDOUS, FISHER u. STERN 1950, SLONIMSKY 1953) mit Medien geringer Zuckerkonzentration gemacht haben, die Atmungssteigerungen und Gärungshemmungen, die in diesem zuckerarmen Medium auftreten, im einzelnen zu verfolgen. Dabei interessierten uns vor allem die Reaktionen, die unmittelbar nach einem Wechsel der Zuckerkonzentration eintreten.

In unseren Versuchen haben wir den Gasstoffwechsel der Hefezellen nicht, wie dies meist geschieht, in Pufferlösung gemessen, sondern in normalem Kulturmedium, um Schädigungen der Hefezellen zu vermeiden, die, wie wir in der vorhergehenden Arbeit feststellen konnten, in Pufferlösung zweifellos auftreten und die Meßergebnisse ungünstig beeinflussen. — In Ergänzung zu den Warburg-Messungen haben wir jeweils noch den Alkohol- und Zuckergehalt des Mediums bestimmt, um die gasvolumetrisch gefundenen Werte für Fragen des Zuckerstoffwechsels, der Atmung und Gärung überhaupt auswerten zu können, da von WINDISCH, HAEHN u. HEUMANN (1953) Zweifel an der Zuverlässigkeit der gasvolumetrisch gefundenen Werte als Maße für Atmung und Gärung geäußert wurden. Außerdem wollten wir uns mit der Kenntnis der Alkohol- und Zuckerkonzentrationen zu verschiedenen Versuchszeiten einen besseren Überblick über die wechselnden Bedingungen verschaffen, denen die Hefen im Laufe eines Versuchs ausgesetzt waren.

* Teil einer Dissertation der Naturwissenschaftl.-mathematischen Fakultät der Universität Freiburg/Brsg. Herrn Prof. MARQUARDT möchte ich für die Überlassung des Themas und die Förderung der Arbeit danken.

Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Material und Methode

Wir verwendeten für unsere Versuche den untergärrigen Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoides* Yeast Foam.

Die Zusammensetzung des synthetischen Mediums, in dem wir die Hefe züchteten und auch die Warburg-Messungen durchführten, die Herführung der Kulturen und Ausführung der Warburg-Messungen nach der direkten Methode von WARBURG (1923), sowie die Zellzählung mit der Zählkammermethode wurde in den Einzelheiten bereits in einer vorhergehenden Arbeit (GREVE 1957) besprochen. Dasselbe gilt für die Alkoholbestimmungen, die nach der nephelometrischen Methode von BÜCHER u. REDETZKY (1951) durchgeführt wurden, sowie für die Zuckerbestimmungen nach der Methode von HAGEDORN u. JENSEN (1923).

Bei Messungen in Medien verschiedener Zuckerkonzentrationen von 12–0,2% hatten wir festgestellt, daß 0,5% Glucosegehalt zunächst am günstigsten für unsere Zwecke war. Höhere Konzentrationen ergaben zu geringe Änderungen gegenüber dem 12%-Glucose-Medium, das bisher verwendet wurde, geringere Konzentrationen hatten zu starke Schwankungen der Werte zur Folge. Die Versuche sind daher, wenn nicht anders angegeben, mit 0,5% Glucose durchgeführt. Im folgenden werden wir die Werte, die wir mit den Warburg-Messungen fanden, zunächst als Gasaufnahme- und Gasabgabewerte bezeichnen, bis durch die ergänzenden Alkohol- und Zuckerbestimmungen geklärt ist, ob sie tatsächlich mit Atmung und Gärung gleichzusetzen sind.

Experimenteller Teil

I. Gasstoffwechsellmessungen

1. Grundversuch

Wir maßen den Gaswechsel 24 Std. alter Hefekulturen in 12% und 0,5% Glucose (Tab. 1). Wie zu erwarten war, ist die Gasaufnahme (O_2) der Kultur in 0,5% Glucose gegenüber derjenigen in 12% Glucose stark herauf- und die Gasabgabe (CO_2) herabgesetzt. Allerdings variierten die Werte von Versuch zu Versuch stark.

Tabelle 1. Gasaufnahme (O_2) und Gasabgabe (CO_2) von Kulturen mit 12 und 0,5% Glucose in μ l/h/100 000 Zellen.
(Die extremsten Werte sind in Klammern angegeben)

	Gasaufnahme	Gasabgabe
12% Glucose	0,018	0,636
0,5% Glucose	0,075 (0,014—0,115)	0,338(0,708—0,075)

Wir stellten uns nun die Frage, zu welchem Zeitpunkt die Änderungen des Gasstoffwechsels stattfanden, ob spontan beim Einbringen der Zellen in die niedere Zuckerkonzentration oder erst nach einer Adaptationszeit.

2. Übertragung in Medien mit geringerem Zuckergehalt

a) Übergang von 12% in 0,5% Zuckergehalt

Spezielle Versuchsanordnung: Von einer 24 Std alten Kultur in 12% Glucose wurden die Zellen abzentrifugiert und mit Phosphatpuffer 3mal gewaschen. Von den gewaschenen Hefen gaben wir soviel in frisches 0,5% glucosehaltiges Medium, daß

die Suspension etwa 3 Millionen Zellen/ccm enthielt. Diese Suspension wurde sofort im Warburg-Apparat gemessen. Von etwa der 10. bis zur 21. Std lasen wir nicht ab. In dieser Zeit wurden die Kölbchen nicht geschüttelt und die Manometer waren geöffnet. Vor Wiederaufnahme der Messungen wurde $\frac{1}{2}$ Std bei geöffneten Manometern geschüttelt.

Die Gasaufnahme (Abb. 1) änderte sich während der ersten beiden Versuchsstunden nicht. Danach setzte eine heftige Steigerung ein bis nach 5 Std das Maximum erreicht war. Die Gasabgabe (Abb. 2) blieb, wie die Gasaufnahme, während der ersten beiden Stunden unverändert. Danach fiel sie innerhalb der nächsten zwei Stunden sehr rasch bis auf 0 ab. Im wesentlichen war die Änderung hier also bereits nach 4 Std beendet. Nach diesem rapiden Abfall sank die Gasabgabe während der nächsten Stunden noch ganz wenig ab. Daß sie dabei negative Werte annahm, ist lediglich eine Folge unserer Darstellungsweise und wird in der Diskussion zu erklären sein.

Der RQ blieb während der ersten Versuchsstunden selbstverständlich entsprechend der sich nicht ändernden Gasaufnahme und Gasabgabe unverändert und sank von der 2. bis zur 5. Std sehr schnell ab. Nach etwa 4 Stunden wurde er kleiner als 1 und hatte seinen geringsten Wert nach 5 tSd mit 0,3 erreicht.

Um festzustellen, ob dem ersten Umschlag im Energiestoffwechsel womöglich noch weitere

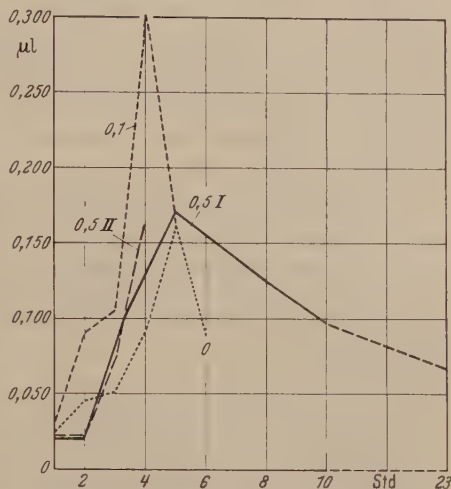


Abb. 1. Die Gasaufnahme von *Saccharomyces cerevisiae* „Yeast Foam“ bei niedriger Zuckerkonzentration in $\mu\text{l/h}/100\,000$ Zellen. Abszisse: Stunden. Ordinate: Gasaufnahme in μl .
 — 0,5 % Glucose, 1. Versuch.
 - - - 0,5 % Glucose, Parallelversuch.
 ····· 0,1 % Glucose. ····· 0 % Glucose

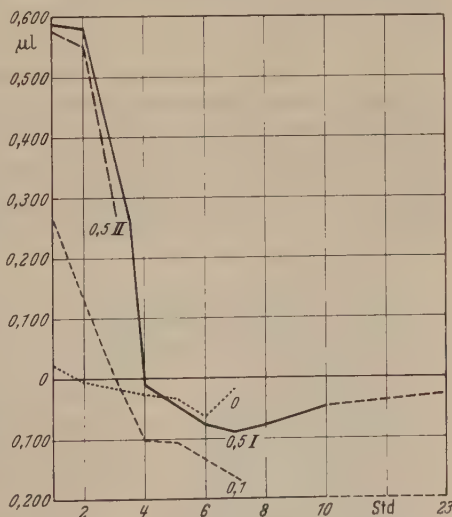


Abb. 2. Die Gasabgabe von *Saccharomyces cerevisiae* „Yeast Foam“ bei niedriger Zuckerkonzentration in $\mu\text{l/h}/100\,000$ Zellen. Abszisse: Stunden. Ordinate: Gasabgabe in μl . Übrige Bezeichnungen wie in Abb. 1

Änderungen folgen, setzten wir die Messungen bis 23 Std nach Übertragung in 0,5 % Glucose fort.

Die Gasaufnahme ging von der 5.—9. oder 10. Versuchs-Std kontinuierlich etwas zurück, aber bedeutend langsamer als sie zunächst zugenommen hatte. Der Wert, der bei Wiederaufnahme der Messung nach 23 Std gefunden wurde, lag dann auch nur noch wenig unter dem nach 10 Std festgestellten und war gegenüber dem Ausgangswert noch etwas um das Dreifache erhöht.

Die Gasabgabe sank nach dem rapiden Abfall während der 2.—4. Std zunächst noch weiter ein klein wenig ab, nahm dann aber wieder etwas zu. Alle diese Änderungen spielen sich im negativen Kurvenbereich ab und sind gegenüber den von der 2.—4. Std gemessenen Änderungen unbedeutend. Der RQ stieg während dieser letzten Versuchsstunden von 0,3 auf 0,6 an.

Aus diesen Ergebnissen war wieder nicht klar, ob die Zeitspanne von 2 Std, die verging, bis eine Änderung in den Gasstoffwechselwerten eintrat, tatsächlich die Adaptationszeit darstellte. Die Möglichkeit, daß erst zum Zeitpunkt der Umstimmung die kritische Zuckerkonzentration erreicht war, auf die eine spontane Reaktion erfolgte, war wieder nicht ausgeschlossen. Sie mußte in diesem Fall zwischen 0,5 und 0 % liegen. Wir stellten daher noch eine weitere Versuchsserie an, in der wir die Hefen aus 12 %igem Glucosemedium in Lösungen mit 0,1 und 0 % Glucose übertrugen und wieder sofort nach dem Mediumwechsel mit der Messung begannen.

b) Übergang von 12% in 0% Zuckergehalt

Spezielle Versuchsanordnung: Die Übertragung aus 12 % in 0,1 oder 0 % Glucose erfolgte im Prinzip wie im vorhergehenden Versuch. Diesmal wurde nur die Zellzahl beliebig gewählt, da sie ohne Bedeutung sein mußte, wenn der kritische Zuckergehalt von vornherein unterschritten war. Außerdem wurden die Hefen anstatt mit Puffer mit dem Medium, das in der folgenden Messung benutzt wurde, gewaschen. Direkt anschließend begannen wieder die Messungen, die wir über nur wenige Stunden durchführten, da hier nur das Anfangsverhalten interessierte.

Da die Messungen in 0,5 % Glucose, die in den Kurven 0,5 I dargestellt sind, etwa 1 Jahr früher vorgenommen wurden als die im folgenden zu besprechenden Versuche, nahmen wir als Kontrolle noch einmal die in den Kurven 0,5 II (Abb. 1 und 2) wiedergegebenen Messungen vor. Die Kurven zeigen wieder die 2stündige Verzögerung in der Umstimmung des Gasstoffwechsels.

Bei den Messungen in 0,1 und 0 % Glucose stellten wir fest, daß die Gasaufnahme sofort nach Übertragung in das Medium niederen Zuckergehalts stark zunahm (Abb. 1) und die Gasabgabe in entsprechende Reaktion spontan abnahm (Abb. 2). Die Verzögerungen, die wir in 0,5 % Glucose beobachtet hatten, traten nicht auf. Daraus mußten wir schließen, daß Gasabgabe und Gasaufnahme gleichermaßen spontan auf den niederen Zuckergehalt eingestellt werden.

Verhielten sich die Hefen in 0,1 und 0% Glucose in bezug auf den Zeitpunkt der Stoffwechselumstellung gleich, so unterschieden sie sich jedoch insofern voneinander, als die Reaktionen in 0,1% Glucose stärker waren als im glucosefreien Medium, d. h. die Gasaufnahme stieg auf einen höheren Wert an und die Gasabgabe sank stärker ab. Eine Deutung dieses Befundes werden wir in der Diskussion geben.

3. Übertragung von niederem in höheren Zuckergehalt

Wir wollten nun unsere bisherigen Ergebnisse womöglich noch durch die umgekehrte Versuchsführung bestätigen, indem wir die Hefen aus Medium mit niederem Zuckergehalt in solches mit höherem Zuckergehalt übertrugen und die Messungen wieder sofort durchführten.

Spezielle Versuchsanordnung: Der Ansatz des Versuchs erfolgte wieder in 0,5% Glucose mit Hefen, die bis zum Versuchsbeginn 24 Std in 12% Glucose gewachsen waren. Dann setzte sofort die Messung ein. In die Seitenbirnen der Reaktionsgefäße gaben wir aber 0,5 ccm 15%ige Glucose-Lösung, die nach Umstellung der Kultur auf niederen Zuckergehalt d. h. 3–4 Std nach Meßbeginn in den Hauptraum eingekippt wurden. In dem so entstandenen Medium von 3% Glucosegehalt setzten wir die Messung ohne Unterbrechung fort, allerdings nur über 2–3 Std, da nach dieser Zeit die starke Gasabgabe eine Messung unmöglich machte.

Wie uns unsere Erfahrungen lehrten, mußten im Verlauf der Messung also zunächst die Werte auftreten, die normalerweise in Medien hohen Zuckergehalts gefunden werden, und danach die Umstellung auf niederen Zuckergehalt einsetzen.

Die Absicht, die wir mit dieser Versuchsanordnung verfolgten, war, das Gasstoffwechselverhalten einer bestimmten Kultur zunächst im Medium hohen Zuckergehalts zu messen (die beiden ersten Stunden in 0,5% Glucose), dann bei derselben Kultur, nachdem sie sich auf den niederen Zuckergehalt eingestellt hatte, die entsprechenden Werte zu erfassen und schließlich bei ununterbrochener Fortführung der Messung wieder in hohen Zuckergehalt zurückzugehen, so daß wir nicht nur einfach die Änderung im Gasstoffwechselverhalten beim Übergang von niederer zu hoher Zuckerkonzentration feststellten, sondern auch noch die Werte in hohem Zuckergehalt vom Beginn der Messung in direkter Kontrolle zur Verfügung hatten.

Tabelle 2. *Gasaufnahme und Gasabgabe bei Rücksetzung in Medien höheren Zuckergehalts in μ l/h/100 000 Zellen. (Extremste Werte in Klammern)*

	Gasaufnahme	Gasabgabe
Beginn 0,5% Glucose	0,022 (0,008—0,049)	0,599 (0,851—0,190)
Ende 0,5% Glucose	0,150 (0,013—0,286)	0,140 (0,235—0,012)
$\frac{1}{2}$ Std 3% Glucose	0,105 (0,013—0,195)	0,507 (0,820—0,334)
2–3 Std 3% Glucose	0,100 (0,013—0,125)	0,533 (0,697—0,504)

In Tab. 2 haben wir die Werte wiedergegeben, die zu Beginn und zu Ende der Messung im 0,5%-Glucose-Medium gefunden wurden und weiterhin diejenigen, die während der ersten $\frac{1}{2}$ Std und nach 2–3 Std im 3%-Glucose-Medium auftraten.

Die Werte sind aus mehreren Versuchen gemittelt. Sie zeigen erhebliche Schwankungen, die sich z. T. daraus erklären, daß der Umschlagpunkt zu starker Gasaufnahme und schwacher Gasabgabe während des Versuchs nur nach dem Augenschein zu bestimmen ist, so daß der Zuckerzusatz nicht jedesmal exakt im gleichen Stadium erfolgte.

Die Gasabgabe steigt also während der ersten $\frac{1}{2}$ Std in 3% Glucose spontan an, bis sie ungefähr den gleichen Wert wie zu Beginn der Messung erreicht, der also dem normalen Verhalten bei hohem Zuckergehalt entspricht. Sie reagiert demnach auf Übertragung in höheren Zuckergehalt genau entsprechend wie beim umgekehrten Wechsel.

Die Gasaufnahme sinkt im Gegensatz dazu nicht wieder auf den Wert ab, den sie vorher bei höherem Zuckergehalt zeigte. Sie wird zwar schwächer, hält sich aber während der ganzen weiteren Versuchsdauer, also während 2—3 Std, auf einem bedeutend erhöhten Wert, so daß diese Änderung im Vergleich zu derjenigen der Gasabgabe nur sehr gering ist.

Die Gasaufnahme wird also nicht spontan wieder auf den erhöhten Zuckergehalt eingestellt. Demnach liegt hier offenbar ein Adaptationsvorgang oder — besser gesagt — ein Deadaptationsvorgang zu Grunde. Dieser Unterschied, den die Gasaufnahme in der Reaktion auf den Konzentrationswechsel in der einen und in der anderen Richtung zeigt, ist zunächst erstaunlich, und zwar um so mehr, nachdem wir bereits festgestellt haben, daß die Gasabgabe auf den Wechsel in beiden Richtungen spontan reagiert. Wir werden eine mögliche Erklärung in der Diskussionserörtern.

II Alkohol- und Zuckerbestimmungen

Spezielle Versuchsanordnung: Die Alkohol- und Zuckerbestimmungen wurden an 24 Std alten 0,5%-Glucose-Kulturen (Grundversuch) und an frisch in 0,5% Glucose eingebrachten Kulturen zu Beginn, nach 3—4 Std und zu Ende der Messungen vorgenommen, und zwar beide Bestimmungen an den gleichen Mediumproben. Der jeweilige Alkohol- oder Zuckergehalt wurde einerseits in Prozent berechnet, andererseits die Entstehung von Alkohol bzw. der Verbrauch von Zucker in m Mol umgerechnet, um auf Vergleichswerte zu den Gasmessungen zu kommen.

1. Ergänzungen zur Messung des Kohlenhydratstoffwechsels

Zunächst führten wir Alkohol- und Zuckerbestimmungen mit der 24 Std alten 0,5%-Glucose-Kultur durch. Dabei ergab sich das Verhältnis Zucker: Alkohol = 1:1,8, das mit dem theoretisch bei alkoholischer Gärung zu erwartenden Verhältnis von 1:2 sehr gut übereinstimmt. Die Gasabgabe-Werte über diese Zeit zu berechnen und zu Zuckerverbrauch und Alkoholbildung in Beziehung zu setzen, war uns leider nicht möglich, da die Gasabgabe während der 24 Meßstunden durch die schnelle Zellvermehrung zu stark wurde. Andererseits konnten die Gasabgabewerte auch nicht interpoliert werden wegen der großen Änderungen, die sie im Bereich der kritischen Zuckerkonzentration erfuhren.

Bei den Kulturen, die frisch in 0,5 % Glucose eingebracht wurden, betrug das Verhältnis Gasabgabe:Alkoholbildung:Zuckerverbrauch bis zur 3. oder 4. Std 1,6 : 1,6 : 1 und stimmt wieder ziemlich gut mit dem theoretischen Verhältnis 2 : 2 : 1 überein. Inwieweit sich ein etwas erhöhter Zuckerverbrauch (nämlich 1 statt theoretisch 0,8), der ja andeutungsweise auch beim ersten Versuch festzustellen war, tatsächlich sichern läßt, ist nicht ganz klar. Die prinzipielle Möglichkeit eines erhöhten Zuckerverbrauchs wird in der Diskussion zu besprechen sein.

2. Änderungen der Alkohol- und Zuckerkonzentrationen

Nachdem wir im vorhergehenden Abschnitt den Verbrauch von Zucker und die Neubildung von Alkohol in absoluten Werten berechnet haben, wollen wir nun noch die wechselnden Konzentrationen von Alkohol und Zucker im Medium betrachten, wie sie sich im Laufe der 23stündigen Messung in 0,5 % Glucose ergaben, da uns die Kenntnis dieser speziellen äußeren Faktoren womöglich für die Erklärung einiger zunächst nicht verständlicher Reaktionsweisen der Kulturen dienen kann.

Der Alkoholgehalt der frisch in 0,5 % Glucose gebrachten Kulturen stieg während der ersten 4 Std von 0 % auf 1,77 % im Mittel an. Danach sank er bis zur 23. Std wieder bis 1,31 % ab, eine sehr auffallende Erscheinung, auf die wir in der Diskussion zu sprechen kommen werden.

Der Zuckergehalt des Mediums sank von Meßbeginn bis zur 4. Versuchsstunde von 0,5 auf 0,05 % ab. Während der folgenden 19 Std änderte sich der Zuckergehalt dann kaum noch. Der Endwert betrug 0,02 %. Ein gewisses Minimum im Zuckergehalt scheint demnach nicht unterschritten zu werden.

Diskussion

Bevor wir an eine Interpretation unseres Gesamtergebnisses gehen können, müssen wir uns darüber klar werden, in welcher Beziehung die von uns gemessenen Gasstoffwechselwerte und der daraus berechnete RQ zu Atmung und Gärung stehen.

Der respiratorische Quotient

Wir hatten gesehen, daß der RQ, der normalerweise bei dem stark gärenden Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* "Yeast Foam", mit dem wir die Versuche durchführten, um 20 beträgt, bei den Messungen in 0,5 % Glucose unter 1 sank, und zwar zunächst bis 0,3. Diesen letzten Wert maßenauch MEYERHOF (1925) und SLONIMSKY (1949). Nach MEYERHOF errechnet er sich, wenn man eine Veratmung von Alkohol annimmt, der eine Resynthese zu Zucker vorausgeht. Da wir sahen, daß nach der 3.—4. Std tatsächlich Alkohol aus unserem Medium verschwindet, der RQ von 0,3 sich aber etwa zur 5.—6. Std einstellt, kann wohl kaum ein Zweifel bestehen, daß wir es in unserem Versuch wenigstens

zeitweise mit Alkoholveratmung nach Resynthese zu Zucker zu tun haben. Diese Annahme wird noch dadurch gestützt, daß auch aus Arbeiten von SPERBER u. RUNNSTRÖM (1938), RUNNSTRÖM, BRANDT u. MAREUSE (1940) sowie PICKET u. CLIFTON (1943) bekannt ist, daß Alkohol in Abwesenheit von Zucker veratmet wird. Allerdings sagen diese Autoren nichts über die Art des Atmungsprozesses aus.

Eine weitere Frage bleibt noch, wie der Wiederanstieg des RQ auf 0,6 zu erklären ist. Er entspricht etwa dem Wert von 0,66, der theoretisch zu erwarten wäre, wenn Alkohol direkt ohne vorherige Resynthese zu Zucker veratmet würde. Wie der Wert bei uns zu verstehen ist, konnten wir nicht endgültig klären. Es bestehen drei Möglichkeiten, die alle dann in Aktion treten müßten, wenn ein Minimum im Alkoholgehalt des Mediums unterschritten ist.

1. Der restliche Alkohol wird direkt veratmet, ohne erst zu Zucker resynthetisiert zu werden. 2. Die Alkoholveratmung geht in der bisherigen Weise unter Resynthese zu Zucker weiter. Gleichzeitig setzt aber schon die endogene Veratmung von Reservekohlehydraten ein, die den $RQ = 1$ hat. Der von uns gemessene RQ würde in diesem Fall einen Mittelwert darstellen. 3. Es liegt bereits eine Veratmung von Fett oder Eiweiß vor. Diese Möglichkeit ist allerdings recht unwahrscheinlich, da anzunehmen ist, daß zu Meßende noch Kohlenhydratreserven in den Zellen vorhanden sind und da außerdem der RQ zu niedrig ist. Er könnte höchstens wieder einen Mittelwert mit dem RQ von 0,3 darstellen.

Gasabgabe und Gärung

Da wir in den beiden Versuchsserien, in denen wir neben den Gasstoffwechselwerten die Alkohol- und Zuckerbildung bestimmt haben, eine gute Übereinstimmung im Verhältnis Alkohol:Zucker:Gasabgabe mit dem bei alkoholischer Gärung theoretisch zu erwartenden Verhältnis festgestellt hatten, dürfen wir jetzt den Schluß ziehen, daß es sich bei den beobachteten Gasabgabewerten tatsächlich lediglich um die abgegebenen Gärungs-Kohlendioxymengen handelt. Dieser Schluß wird auch durch den geringen Mehrverbrauch von Zucker, den wir beobachteten, nicht beeinträchtigt, da einerseits für Synthesezwecke zusätzlich Zucker verbraucht wird und andererseits — wie wir in der vorhergehenden Arbeit ausführlicher besprochen haben — immer zunächst ein Zuckerschwund beobachtet wird, wenn Hefen in frisches Nährmedium gebracht werden. Damit erklärt sich auch, daß der beobachtete Mehrverbrauch nach 3—4 Std relativ größer war als nach 24 Std. Insgesamt ergibt sich aus diesen Überlegungen also, daß die Übereinstimmung zwischen Gasabgabewerten und Alkoholbildung so gut ist, daß wir keinen nennenswerten Fehler begehen können, wenn wir die Gasabgabe mit der Kohlendioxymbildung durch Gärung gleichsetzen. Sollte doch ein geringer Fehler vor-

liegen, fällt er jedenfalls gegenüber den großen Änderungen der Gasabgabe oder — wie wir jetzt sagen können, der Gärung — nicht ins Gewicht.

Jetzt bleiben noch die Werte zu besprechen, die wir bei den Messungen in 0,5 % Glucose im negativen Kurvenbereich (Abb. 2), d. h. nach Beendigung der Gärung, ermittelten. Wir erwähnten bereits, daß sie sich lediglich aus unserer besonderen Darstellungsweise ergeben. Es lag uns daran, die Atmungs- und Gärungswerte getrennt zu erfassen. Deshalb korrigierten wir die Gasabgabewerte nicht für den Anteil, der durch die Gasaufnahme verdeckt wurde, denn wir mußten annehmen, daß es gerade der Anteil der Gasabgabe war, der der CO_2 -Abgabe durch die Atmung entsprach, da der RQ für die Atmung = 1 sein sollte. Im Augenblick, in dem die Gärung aufhörte und zur Atmung noch der zusätzliche Sauerstoffverbrauch durch die Alkohol-Resynthese zu Zucker kam, der RQ also kleiner als 1 wurde, mußten bei unserer Darstellungsweise negative Werte auftreten. Daß die Gasabgabe nicht tatsächlich negativ sein kann, ist selbstverständlich, und wir können annehmen, daß die Gasabgabe durch Gärung mit aller Wahrscheinlichkeit den Wert 0 hat.

Gasaufnahme und Atmung

Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der Gasabgabe können wir die Werte der Gasaufnahme nicht ohne weiteres als der Atmung entsprechend sichern. In den Zeiten der lebhaften Gärung, während derer wir unsere erhaltenen Werte mit Hilfe von Alkoholbestimmungen überprüfen konnten, war die Atmung so gering, daß die Werte innerhalb des Fehlerbereichs der Alkoholbestimmungen lagen. Dazu kommt noch der Einwand von WINDISCH, HAEHN u. HEUMANN (1953), wonach speziell im vermehrungsfähigen Zustand der Hefen eine Fehlerquelle bei der Atmungsmessung auftreten soll. Wir haben aber bereits in der vorhergehenden Arbeit festgestellt, daß wir eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs, die nicht auf Atmung, sondern auf Synthesevorgängen beruht, auch bei Kulturen, die sich vermehrten, nicht erkennen konnten. Daraus hatten wir geschlossen, daß wir auch die Gasaufnahmewerte als der Atmung entsprechend ansehen dürfen. Im ganzen gesehen scheint im Bereich der hohen Zuckerkonzentrationen, die den Verhältnissen in den Versuchen der ersten Arbeit entsprechen, die Übertragung dieser Schlußfolgerung auf die Messungen der vorliegenden Arbeit erlaubt zu sein.

Wie es im Bereich der niederen Zuckerkonzentrationen mit dem Verhältnis von Gasabgabe zu Atmung aussieht, ist daneben weit schwerer zu entscheiden. Die Frage lautet hier vor allem: beruht das Ansteigen der Gasaufnahme bei geringer Zuckerkonzentration tatsächlich auf einer Atmungssteigerung oder welche anderen Prozesse können zu einer erhöhten Gasaufnahme führen?

Wir hatten bei der Besprechung des RQ festgestellt, daß nach Verbrauch des Zuckers offenbar Alkohol zu Zucker resynthetisiert wird. Dieser Vorgang verbraucht aber Sauerstoff, was sich in dem niederen RQ ausdrückt. So wäre es also denkbar, daß die erhöhte Gasaufnahme sich aus dem Sauerstoffverbrauch zum Zwecke einer Zuckerresynthese herleitete, während die Atmung unverändert bliebe. Wenn wir uns aber die Kurven für Gasabgabe und Gasaufnahme in 0,5% Glucose noch einmal unter diesem Gesichtspunkt betrachten, sehen wir, daß die Gasaufnahme in ihrem Maximum, d. h. zu der Zeit, zu der wir den RQ von 0,3 und damit den Synthesevorgang feststellten, gerade um so viel über dem Endwert der Gasaufnahme nach 23 Std liegt, wie die Gasabgabe in ihrem Minimum unter 0 sinkt. Da wir aber gesehen haben, daß die negativen Kurvenwerte für die Gasabgabe nur dadurch zustande kommen, daß wir die Gasaufnahmewerte nicht addiert haben, heißt das, daß der Teil der Kurven, in dem sie unter 0 sinken bzw. über den Endwert steigen, als nicht der Sauerstoffaufnahme zur Atmung entsprechend angesehen werden muß. Aber auch wenn wir diesen Wert von der gemessenen Gasaufnahme abziehen, bleibt noch eine gesteigerte Atmung erhalten, die sich etwa in der Höhe des Endwertes hält, d. h. noch 3 mal so groß ist, wie die Atmung zu Beginn des Versuches war. Selbst wenn wir aber an diesem Endwert noch Zweifel haben, weil wir auch zu Meßschluß noch negative Gasabgabewerte beobachteten, entsprechend dem RQ von 0,6, den wir nicht sicher zu erklären vermochten, können wir auch diesen Wert der negativen Gasabgabe noch von der Gasaufnahme abziehen. Trotzdem bleibt die Gasaufnahme noch um das Doppelte gegenüber dem Ausgangswert erhöht, und für diese Steigerung kann dann schließlich nur noch die Atmung verantwortlich sein.

Noch eine andere Beobachtung unserer Versuche läßt deutlich erkennen, daß die Atmung bei niedriger Zuckerkonzentration erhöht ist. Das ist die Fortdauer der erhöhten Gasaufnahme, nachdem dem Medium erneut Zucker zugesetzt wird. Die Alkoholveratmung, einerlei ob mit oder ohne Resynthese, müßte in diesem Augenblick aufhören, wie aus Beobachtungen von SPERBER u. RUNNSTRÖM (1938), RUNNSTRÖM, BRANDT u. MAREUSE (1940) sowie PICKET u. CLIFTON (1943) zu schließen ist. Diese Autoren führten aus, daß Alkohol nur veratmet wird, solange das Medium keinen Zucker enthält. Daß die Gasaufnahme auch nach Zuckerzusatz noch deutlich gegenüber der Kontrolle erhöht bleibt, dürfte also als ein weiteres Zeichen dafür angesehen werden, daß die gesteigerte Gasaufnahme Ausdruck einer Atmungssteigerung ist. Wie weit wir nach diesen Überlegungen die Gasaufnahmewerte in den einzelnen Versuchsphasen als der Atmung entsprechend ansehen können, werden wir im folgenden Abschnitt an den entsprechenden Stellen erörtern.

*Reaktion von Atmung und Gärung
auf Wechsel der Zuckerkonzentration*

Nachdem wir uns soweit Klarheit über die Beziehung zwischen den gemessenen Gasstoffwechselwerten und Atmung und Gärung verschafft haben, bleibt nun noch zu besprechen, was die beobachteten Atmungs- und Gärungsänderungen bedeuten.

Obwohl bereits seit langem bekannt ist, daß der Zuckergehalt des Nährmediums Atmung und Gärung stark beeinflußt, sind die physiologischen Vorgänge, die sich dabei abspielen, noch nicht aufgeklärt. Unsere Befunde können zur Lösung dieses Problems einige Beiträge liefern. Wir hatten gesehen, daß die Gasabgabe bei Überführung der Hefen in Medien höheren oder niederen Zuckergehalts immer spontan geändert wird. Da wir andererseits festgestellt haben, daß die Gasabgabe der Gärung entspricht, können wir also aussagen, daß die Gärung spontan auf den jeweiligen Zuckergehalt eingestellt wird.

Anders liegen die Verhältnisse für die Atmung. Bei der Messung der Gasaufnahme hatten wir beobachtet, daß auf den Übergang in niedere Zuckerkonzentration eine spontane Steigerung der Gasaufnahme erfolgte. Da wir sahen, daß die Gasaufnahme sich in den ersten Stunden nach Verbrauch des Zuckers aus Sauerstoffverbrauch für Atmung und für Resynthese des Alkohols zu Zucker zusammensetzt, ist leider nicht zu entscheiden, ob hier auch eine spontane Atmungssteigerung infolge der veränderten Zuckerkonzentration vorliegt oder ob der Anstieg zunächst nur von dem Synthesesauerstoff bewirkt wird.

Sicher ist dagegen die Aussage, die wir über das Atmungsverhalten beim Übergang von niederem in hohen Zuckergehalt machen können. Wir hatten gesehen, daß die Gasaufnahme in dieser Versuchsphase mit größter Wahrscheinlichkeit lediglich auf Sauerstoffverbrauch zur Atmung beruht. Die Gasaufnahme hatte sich aber bei Übertragung der Hefen von niederem in höheren Zuckergehalt nur sehr gering geändert und sich nicht auf die Werte, die gewöhnlich bei hohen Zuckerkonzentrationen beobachtet werden, eingestellt. Daraus dürfen wir schließen, daß der Atmung mindestens beim Wechsel der Bedingungen in dieser Richtung ein adaptiver Vorgang zugrunde liegt.

Welche Erklärung gibt es nun für diese Erscheinung, durch die sich das Atmungsverhalten klar vom Gärungsverhalten unterscheidet, von der wir nur leider nicht wissen, ob sie sich beim Konzentrationswechsel in beiden Richtungen gleichmäßig abspielt?

Die folgende Hypothese könnte die beobachteten Vorgänge deuten: Beim Aussetzen der Gärung tritt ein atmungssteigerndes System in Aktion, etwa in dem Sinne, daß nur bei Abwesenheit der Gärung ein solcher physiologischer Zustand in der Zelle geschaffen wird, daß Atmungsenzyme oder eine andere zur Atmung notwendige Substanz in

größerer Menge gebildet oder in aktiven Zustand versetzt werden können. Bei Wiedereinsetzen der Gärung wäre das Atmungsenzym dann einmal vorhanden und bliebe weiter wirksam. Für diese Erklärung spricht vor allem die Beobachtung SLONIMSKYS (1955), daß eine Art Konkurrenz um Phosphate oder Eiweiß zwischen Atmung und Gärung zu bestehen scheint, bei der offenbar die Gärung der Atmung überlegen ist. Unter dieser Voraussetzung könnte man daher in unseren Versuchen annehmen, daß die Atmungsenzyme, nachdem sie einmal gebildet sind, auch weiter tätig bleiben und die Atmung auch durch die wiedereinsetzende Gärung nicht mehr beeinträchtigt wird. Nach dieser Theorie müßte die Atmung allerdings infolge der Zellvermehrung, der eine entsprechende Neubildung der kritischen Substanz nicht mehr parallel geht, allmählich wieder nachlassen. Leider konnten wir in unseren Versuchen wegen der zu starken Gärungssteigerung nicht länger verfolgen, ob das tatsächlich der Fall ist. In der Zeit, die uns zur Beobachtung zur Verfügung stand, machte sich immerhin eine sinkende Tendenz der Atmungsintensität bemerkbar.

Zusammenfassung

1. Die bekannte Tatsache, daß geringer Zuckergehalt des Nährmediums eine verstärkte Atmung und verminderte Gärung von Hefezellen zur Folge hat, wurde an *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellips.* *Yeast Foams* bestätigt.
2. Nach Verbrauch des Zuckers wurde eine Alkoholveratmung beobachtet, der mit großer Wahrscheinlichkeit eine Resynthese zu Zucker vorausgeht.
3. Die Umstellung der Gärung setzte sowohl bei Übertragung in ein Medium geringerer Zuckerkonzentration als auch in eines mit höherer Zuckerkonzentration spontan ein.
4. Für die Atmung war beim Übergang von höherem in niederen Zuckergehalt nicht zu sichern, ob eine spontane oder adaptive Reaktion erfolgte. Bei Übertragung in höhere Zuckerkonzentration änderte sich die Atmung nicht spontan.
5. Die Möglichkeit wird erörtert, daß die Atmungssteigerung auftritt, wenn mit dem Nachlassen der Gärung die Konkurrenz um eine kritische Substanz aufgehoben ist, und Atmungsenzyme gebildet oder aktiviert werden können.

Literatur

- ALDOUS, J. G., K. C. FISHER and J. R. STERN: The respiration of yeast at different concentration of glucose. *J. Cellul. a. Comp. Physiol.* **35**, 303 (1950).
- BÜCHER, TH., u. H. REDETZKY: Eine spezifische photometrische Bestimmung von Äthylalkohol auf fermentativem Wege. *Klin. Wschr.* **1951**, 615.

COMMONER, B.: The effect of cyanide on the respiration of baker's yeast in various concentration of dextrose. *J. Cellul. a. Comp. Physiol.* **13**, 121 (1939).

GEIGER-HUBER, M.: Über den Einfluß der Konzentration des Atmungsmaterials auf die Atmungsgeschwindigkeit von Pflanzen. *Jb. Bot.* **81**, 1 (1935). — GREVE, E.: Untersuchungen über das Atmungsverhalten von Hefen I. *Arch. Mikrobiol.* **26**, 254 (1957).

HAGEDORN, H. C., u. B. N. JENSEN: Mikrobestimmungen des Blutzuckers mittels Ferricyanid. *Biochem. Z.* **146**, 135 (1923). — HOPKINS, R. H. and R. H. ROBERTS: The kinetics of alcoholic fermentation of sugars by brewer's yeast. *Biochemic J.* **29**, 919 (1935).

MEYERHOF, O.: Über den Einfluß des Sauerstoffs auf die alkoholische Gärung der Hefe. *Biochem. Z.* **162**, 43 (1925). — MEYERHOF, O., u. K. IWASAKI: Über den Einfluß der Gärungsgröße und des Oxydationsquotienten der Hefe. *Biochem. Z.* **226**, 16 (1930).

PICKET, M. J., and C. F. CLIFTON: The effect of selective poisons on the utilisation of glucose and intermediate compounds by microorganisms. *J. Cellul. a. Comp. Physiol.* **22**, 147 (1943).

RUNNSTRÖM, J., K. BRANDT u. R. MAREUSE: Die Assimilation von Ammoniak durch Bäckerhefen unter aeroben und anaeroben Bedingungen. *Ark. Kemi (Stockh.)* **14**, No 1/18 (1940).

SLONIMSKY, P.: Action de l'acriflavin sur les levures. IV. Mode d'utilisation du glucose par les mutants "Petite Coloni". *Ann. Inst. Pasteur* **76**, 510 (1949). — La formation des enzymes respiratoires chez la levure. *Actualités Bioch.* Nr. 17, Paris 1953. — Adaptation respiratoire: Développement du système hémoprotéique induit par l'oxygène. 3ième congrès international de biochimie, Bruxelles 1955, Conférences et rapport. S. 242. — SPERBER, E., u. J. RUNNSTRÖM: Über die Konkurrenz einiger Substrate um die Enzyme der lebenden Zellen der Bäckerhefe. *Biochem. Z.* **300**, 373 (1938).

WARBURG, O.: Versuche an überlebendem Carcinomgewebe. *Biochem. Z.* **142**, 317 (1923). — WINDISCH, F., H. HAEHN u. W. HEUMANN: Irreversibilität der aeroben Spaltkraft bei optimaler Sauerstoffversorgung der Zelle. *Z. Naturforsch.* **86**, 436 (1953).

(Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica della Università di Perugia, Italia)

Neue Hefen, isoliert aus Böden Spaniens II: *Torulaspora franciscae* nov. spec.

Von

A. CAPRIOTTI

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Juli 1957)

Im Oktober 1955 (CAPRIOTTI 1957 a) konnten wir bei der Untersuchung von 8 Erdproben Spaniens 12 verschiedene Hefearten isolieren, von denen 4 als neue Arten betrachtet werden mußten. Es waren dies *Schwanniomyces castellii* nov. spec., welche ich bereits beschrieben habe (CAPRIOTTI 1957 b); ferner um 2 Arten von *Zygosaccharomyces*, die ich in einer nächsten Veröffentlichung zusammen mit zwei anderen Formen von *Zygosaccharomyces*, isoliert aus italienischen Böden (CAPRIOTTI 1955 a), behandeln werde, und um eine Form der Gattung *Torulaspora*, die in dieser Veröffentlichung ausführlich behandelt werden soll. Für sie schlage ich den Namen *Torulaspora franciscae* nov. spec. vor.

Herkunft der Stämme: 13 Stämme wurden aus einer Bodenprobe von Tumbleque, Provinz Toledo, Spanien, isoliert. Dieser Boden wird mit Wein bebaut, ist braun, locker-sandig, hat einen pH -Wert von 7,2—7,4 und enthält 32% $CaCO_3$.

Untersuchungstechnik: Die Untersuchungstechnik stimmt überein mit der von STELLING-DEKKER (1931) und der von LODDER u. KREGER VAN RIJ (1952), ausgenommen die Zuckerassimilationsproben. Für diese wurde auf gekochtem und gewaschenem Agar kultiviert (CAPRIOTTI 1955a, 1955b).

Beschreibung der Eigenheiten der *Torulaspora franciscae* nov. spec.

Wachstum auf Malzabsud und Traubenmost: Nach 3 Tagen bei 25 °C: kugelförmige Zellen, rund oder leicht oval bis zu $3-8\mu$, isoliert, öfters aber auch vereint zu Gruppen und zahlreiche Knospen bildend.

Die Zellen zeigen im Inneren einen im allgemeinen exzentrischen Kern, der bis zu $4,2\mu$ im Durchmesser erreichen kann. Um die Mutterzelle herum lassen sich oft Knospen verschiedener Größe beobachten, immer aber viele kleinere Knospen.

Gärung und Niederschlag: In älteren Kulturen lassen sich Zellen beobachten, die 1—2—3 für *Torulaspora rosei* typische Fortsätze haben. Nach einem Monat klare Flüssigkeit, Niederschlag und Spuren eines unkompletten Ringes.

Wachstum auf Traubenmost: Nach 3 Tagen bei 25 °C kugelförmige Zellen von $3-7\mu$, einzeln oder zu Gruppen vereint.

Wachstum auf Würze-Agar: Nach 3 Tagen bei 25 °C kugelförmige oder leicht ovale Zellen, einzeln, zu zweien oder auch zu Gruppen von $3-7,5\mu$, die viele Knospen treiben. — Strichkultur: weißlich, wachsern, reichlich, leuchtend, platt und glatt; alte Kulturen neigen dazu, eine leichte Ockerfärbung anzunehmen.

Die Zellen treiben 1—2 Auswüchse (Abb. 1), die mit der Zeit an ihrem äußersten Ende eine, zwei oder auch drei Knospen treiben (Abb. 2); die Knospen liegen entlang der Achse des Fortsatzes oder aber auch seitlich davon. Die Knospen sind im allgemeinen viel kleiner als die Mutterzelle; manchmal jedoch, wenn es sich nur um eine Knospe handelt, kann diese derartig wachsen, daß sie fast die Größe der

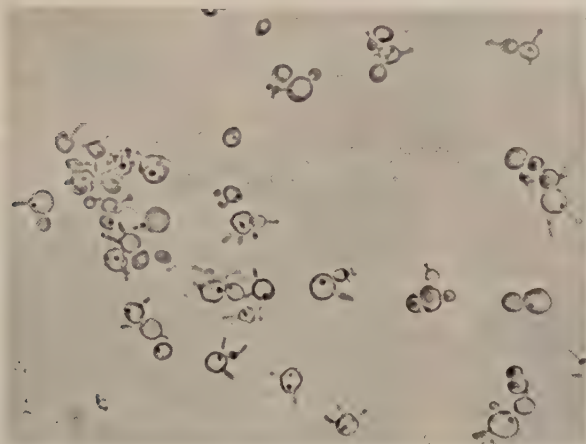


Abb. 1. *Torulaspora franciscæ* nov. spec. (Vergrößert 600fach).
Würze-Agar-Kultur mit Protuberanzen

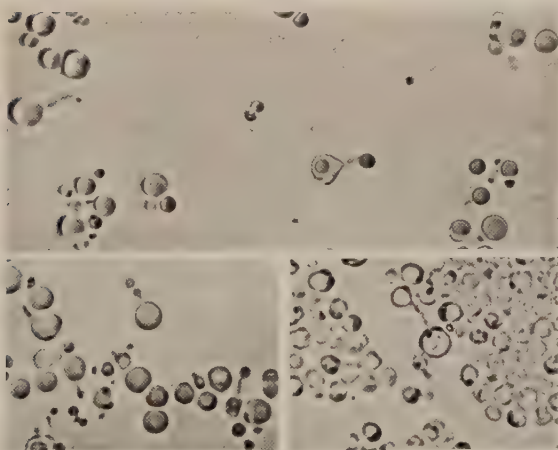


Abb. 2. *Torulaspora franciscæ* nov. spec. (Vergrößert 600fach).
Würze-Agar-Kultur, Protuberanzen mit Knospen

Mutterzelle erreicht. In diesem Falle hat es den Anschein, als ob eine wahre Kopulation vorläge, die sich aber nicht nachweisen läßt; die Knospe bleibt gut erkennbar und es lassen sich keinerlei Unterbrechungen auf ihrer Membran nachweisen.

Wachstum auf Kartoffel-Agar: Nach 3 Tagen bei 25° C, runde bis ovale Zellen von derselben Größe wie auf Würze-Agar. — Strichkultur wie auf Würze-Agar.

Wachstum auf Karotten-Agar: Nach 3 Tagen bei 25° C Einzelzellen und Zellen zu zweien, knospentreibend, vorwiegend rund von $(3-6) \times (3,5-7,2) \mu$. Vorhandensein runder Zellen, die bis zu 8μ Durchmesser erreichen können und 1-2-3 Auswüchse treiben. — Strichkultur weißlich, etwas schleimig, glatt, leuchtend, und ziemlich reichlich.

Wachstum auf Bohnen-Agar: Nach 3 Tagen bei 25° C rundliche oder leicht elliptische Zellen von $(2,5-5) \times (2,6-5,2) \mu$, isoliert oder vereint zu zweien mit 1-2-3 Fortsätzen. — Strichkultur weißlich-gelb, wächsern, leuchtend und nicht sehr reichlich, Oberfläche punktiert, Rand glatt oder leicht uneben.

Wachstum auf Kartoffeln: Nach 3 Tagen bei 25° C runde oder leicht elliptische Zellen von $(3-7) \times (3,5-7,5) \mu$, einzeln oder zu zweien oder dreien vereint; Vorhandensein von Zellen mit Auswüchsen. — Strichkultur von weißlicher Farbe, leuchtend, wächsern, glatt, reichlich. Nach einem Monat wird die Farbe schmutzig-weiß.

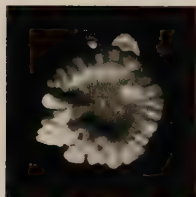


Abb. 3. *Torulaspora franciscæ* nov. spec. Riesenkultur nach 4 Wochen auf Würzegeatine

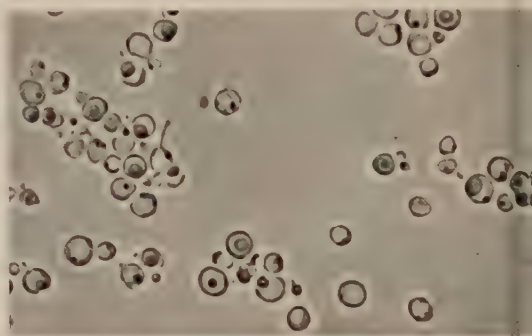


Abb. 4. *Torulaspora franciscæ* nov. spec. (Vergrößert 600fach). Würze-Agar-Kultur, Asci mit 1-2 Sporen

Wachstum auf Fleisch-Agar: Kein Wachstum.

Objektträgerkultur: Keine Bildung von Pseudomycel.

Wachstum auf Würzegeatine: Einzeln liegende Kolonien, weißlich, erhöht und nicht fließend. Bei der Gelatineverflüssigung hat sich nach 60 Tagen bei 18° C eine Kolonie von weiß-schmutzig-gelblicher Farbe gebildet; spärliche Abspaltung und verspätetes Flüssigwerden.

Die Riesenkolonie (Abb. 3) zeigt nach 3 Tagen bei 18-20° C einen nicht sehr tiefen zentralen Krater von 1 cm Durchmesser und aufeinanderfolgende runde Hofbildungen von 3-4 mm, strahlenförmig gelappte und leicht unregelmäßige Ränder. Die Kolonie ist eher erhöht und zeigt eine weiß-schmutzig-tabakbraune Farbe; aber in den äußersten Teilen des Randes können sich Zonen von ausschließlich weißer Farbe finden. Hier liegen auch runde Zellen mit einem großen Fettkern, die an die Zellen „*Pulcherrima*“ erinnern.

Im Zentrum der Kolonie, wo, wie gesagt, die Farbe weiß-schmutzig-tabak-braun ist, sind dagegen die Zellen normal wie in anderen Substraten, und eine Anzahl von ihnen ist relativ groß und in Verschmelzung (Fusion) und bildet Asci mit zwei Sporen.

Sporenbildung: Auf Würze-Agar und Gorodkowa-Agar parthenogene Asci mit 1-2 Sporen (Abb. 4), rund, mit glatten Wänden, welche innen einen kleineren Kern zeigen. Es können auch Fälle von Konjugationen zwischen den Protuberanzen festgestellt werden, die 2 Sporen enthaltende Asci bilden. Manchmal scheint es sogar, als gäbe es eine Konjugation zwischen der Mutterzelle und der Knospe, die sich auf dem Auswuchs entwickelt hat; indessen bleibt die Membran der Knospe immer unversehrt.

Gärung: Glucose +; Galaktose +; Maltose + (langsam); Saccharose +; Raffinose + $\frac{1}{3}$; Lactose -; Inulin + (manchmal langsam); Dextrin -.

Assimilation der organischen Säuren ($p_H = 4,5$): Weinsäure -; Äpfelsäure -; Citronensäure -; Bernsteinsäure -; Oxalsäure -; Milchsäure +; Brenztraubensäure \pm .

Zuckerassimilation: Glucose +; Galaktose +; Maltose +; Saccharose +; Raffinose +; Lactose -.

Stickstoffassimilation: Kaliumnitrat -; Ammoniumsulfat +; Asparagin +.

Wachstum mit Äthylalkohol als Wachstumssubstrat: Spärliches Wachstum.

Arbutinspaltung: Negativ.

Gärungsvermögen: In normalem Traubenmost mit $p_H = 3,5$: Alkoholgehalt 4,58 bis 6,05%.

Diskussion

Auf Grund der sehr interessanten Untersuchungen von WINGE (1935, 1937, 1939) sowie von LINDGREN u. Mitarb. (1942a, 1943b, 1944a, 1944b, 1945), in welchen gezeigt wurde, daß *Zygosaccharomyces* die haploide Form von *Saccharomyces* darstellt, haben LODDER u. KREGER VAN RIJ in ihrer Klassifikation von 1952 die Gattungen *Zygosaccharomyces* und *Torulaspora* aufgehoben und sie der Gattung *Saccharomyces* in den relativen Species zugeteilt.

In der Behandlung von *Torulaspora nilssoni* (CAPRIOTTI 1957b) haben wir dargelegt, daß wir der Arteinteilung der beiden holländischen Forscher nicht zustimmen können, wenngleich sie auch auf einer soliden wissenschaftlichen Basis beruhe. Unserer Meinung nach entsteht bei dieser Arteinteilung eine derart quasi elefantenhafte *Saccharomyces*-Gattung, daß dies für eine spezielle Bezugnahme bestimmt keine Erleichterung darstellen dürfte.

Dazu käme, unserer Ansicht nach, die Leichtigkeit, mit der diese drei Gattungen auseinandergehalten werden können. Und zwar durch die Art und Bildung der Asci, durch die Form der Zellen und durch das Vorhandensein der Protuberanzen. Auf diese Argumente möchten wir um so mehr zurückkommen, als wir dabei sind, ein vergleichendes Studium über *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces* und *Torulaspora* durchzuführen.

In der heutigen Veröffentlichung beschränken wir uns darauf, zu erwähnen, daß es bei den normalen mikroskopischen Untersuchungen einer sehr großen Anzahl von Arten und Stämmen, die *Zygosaccharomyces* zuzuteilen sind, immer verhältnismäßig leicht war, eindeutige Fälle von Konjugationen der Zellen zu beobachten; dagegen konnten wir dies bei einem noch größeren Untersuchungsmaterial der *Saccharomyces* zuzuteilenden Arten nicht feststellen. Die der *Torulaspora* zuzuteilenden Arten, die gar keine Asci aus Konjugation hervorbringen oder bzw. nur ganz außerordentlich selten im Verhältnis zu den anderen parthenogenen, unterscheiden sich eindeutig von den Arten, die sonst normalerweise den beiden anderen Gattungen zugeteilt werden, und zwar

besonders durch die verschiedene Form und die Ausmaße der Zellen sowie auch durch die typische Bildung der Protuberanzen. Unserer Meinung nach könnten also diese Besonderheiten das Weiterbestehen der Gattung *Torulaspora* auch gegenüber *Saccharomyces* rechtfertigen.

Die Form, die wir aus spanischem Boden isoliert und *Torulaspora franciscae* benannt haben, ist identisch mit *Torulaspora rosei* Guilliermond, *Torulaspora fermentati* Saito und mit *Torulaspora nilssoni* Capriotti auf Grund der Form der Zellen, der Besonderheiten der Strichkultur der flüssigen Kulturen, der Fähigkeit, Insulin zu fermentieren, der Unfähigkeit, Arbutin zu spalten und der Eigenheiten bei der Stickstoffassimilation.

Tabelle 1

	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Torulaspora rosei</i>	<i>Torulaspora fermentati</i>	<i>Torulaspora nilssoni</i>	<i>Torulaspora franciscae</i>
Gärung:					
Glucose	+	+	+	+	+
Galaktose	+	—	—	+	+
Maltose	—	—	+	—	+
					(langsam)
Saccharose	—	+	+	+	+
Raffinose	—	+ $\frac{1}{3}$	+ $\frac{1}{3}$	+	+ $\frac{1}{3}$
Inulin		+	+	+	+
Dextrin	—	—	—	—	—
Zuckerassimilation:					
Glucose	+	+	+	+	+
Galaktose	+	—	—	+	+
Maltose	—	—	+	—	+
Saccharose	—	+	+	+	+
Raffinose	—	+	+	+	+
		(schwach)	(schwach)		
Lactose	—	—	—	—	—

Jedoch zeigt *Torulaspora franciscae* eine ausgeprägtere Tendenz, durch Konjugation Asci hervorzubringen, die sich bei den anderen Arten viel seltener beobachten läßt. Im Hinblick auf die Größe der Zellen nähert sie sich mehr der *Torulaspora fermentati*. Die in Tab. 1 aufgeführten Unterschiede haben uns dazu bewogen, *Torulaspora franciscae* spec. nov. beizubehalten.

Daraus geht eindeutig hervor, daß sich *Torulaspora franciscae* nov. spec. von den anderen *Torulaspora*-Arten folgendermaßen unterscheidet: Von *Torulaspora delbrueckii* Lindner dadurch, daß sie mehr Maltose, Saccharose und Raffinose vergärt und assimiliert; — von *Torulaspora rosei* Guilliermond dadurch, daß sie mehr Galaktose und Maltose vergärt und assimiliert; — von *Torulaspora fermentati* Saito dadurch, daß sie mehr Galaktose vergärt und assimiliert; — von *Torulaspora nilssoni* Capriotti dadurch, daß sie mehr Maltose vergärt und assimiliert und daß sie Raffinose zu einem Drittel vergärt.

1956, also ein Jahr vor der Isolierung des heute zur Diskussion stehenden Stammes, hat VAN DER WALT (1957) *Saccharomyces pretoriensis* beschrieben, der aus Erdböden Pretorias in Südafrika isoliert wurde und beachtenswerte Ähnlichkeit mit unserem Stamm hat. Gelegentlich eines kürzlichen Besuches VAN DER WALTs in unserem Institut haben wir diese Frage besprochen und es für erforderlich gehalten, eine vergleichende Untersuchung über beide Stämme durchzuführen. Die dabei festgestellten Unterschiede sind folgende:

*Saccharomyces pretoriensis*¹ vergärt keine Galaktose oder vergärt sie nur sehr schwach und langsam und vergärt kein Inulin; bei unserem Stamm dagegen ist die Vergärung prompt und kräftig, sowohl bei Galaktose wie auch bei Inulin, aber langsam bei Maltose.

Ein anderer beachtlicher Unterschied ging aus der Bestimmung des Gärungsvermögens hervor: während *Saccharomyces pretoriensis* ungefähr 12% Alkoholgehalt produziert, gelingt es unserem Stamm nicht, mehr als 6% Alkoholgehalt zu produzieren.

Auf Grund der beobachteten Unterschiede können wir festhalten, daß *Torulaspora franciscae* auch von *Saccharomyces pretoriensis* verschieden ist, welche, wie es scheint, *Torulaspora fermentati* um sehr vieles näher steht.

Latina diagnosis

Torulaspora franciscae nov. spec.

Maltato in musto cellulae rotundae atque leniter ovoideae (3–8) micron, singulae, binae aut acervatim inveniuntur. Sedimentum efficitur. — In agar maltato cellulae rotundae aut leniter ovoideae (3–7,5) micron, singulae vel binae acervatim. Adsunt etiam cellulae cum singulo vel plurimo tubere quod numquam copulatur, quandoquidem signato notatoque bifurcato et saginatione summo in vertice. — Observantur etiam, at perraro, cellulae multis gemmis prebitae. — Cultura (unum post mensem, 17° C) oculis subicitur albiflava, aequa, glabrae, aliquanto tenuis, copiosa, margine levi. — Pseudomycelium deest. Asci plerumque formantur sine vel cum copulatione. Ascospore glabrae, rotundae 1–2 pro asco. — Glucosus, galactosus, maltosus, saccharus, atque raffinosis pro tertia parte fermentatur. — Minerali in medio cum glucoso, galactoso, maltoso, saccharo atque raffinoso (tenuiter) crescit. — Nitras kalicus non assimilatur. — Minerali in medio cum alcohole aethylico parumper crescit. — Arbutinum non finditur. — In mediis cum glucoso format 4,58–6,05% alcoholis partes in volumine.

Literatur

CAPRIOTTI, A.: Riv. Biol. **47**, 2, 209 (1955a) — Biochimica applicata **2**, 1, 31 (1955b). — Riv. Biol. **47**, 3, 343 (1955c). — In corso di stampa (1957a). — Arch. Mikrobiol. **26**, 434 (1957b). — LINDEGREN, C. C., u. G. LINDEGREN: Proc. Nat. Acad. Sci. **29**, 306 (1943a) — Ann. Missouri Bot. Garden **30**, 453 (1943b). — **32**, 419 (1944a). — LINDEGREN, C. C.: Wallest. Lab. Comunicat. **7**, 153 (1944b). — Bacter. Rev. **9**, 111 (1945). — LODDER, J., u. N. J. W. KREGER VAN RIJ: The Yeasts. North Holland-Publishing Company, Amsterdam (1952). — STELLING-DEKKER, N. M.: Die sporogenen Hefen, Verhandl. Koninkl. Akad. Wetenschap. Afd. Natuurkunde, Sect. II, **28**, 1 (1931). — VAN DER WALT, J. P., u. I. T. J. TSCHIEUSCHNER: Gen. Microbiol. **14**, Nr. 2, 486 (1956). — WINGE, O.: Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg **21**, 77 (1935). — WINGE, O., u. O. LAUSTEN: C. r. Trav. Lab. Carlsberg **22**, 99 (1937); **22**, 337 (1939).

¹ Der Stamm von *Saccharomyces pretoriensis* wurde uns freundlicherweise vom C. B. S. Delft zur Verfügung gestellt, welchem Institut wir hiermit unseren Dank aussprechen.

Debaryomyces castellii nov. spec.

Eine neue Hefe aus Boden Schwedens

Von

A. CAPRIOTTI

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Juli 1957)

Wie kürzlich berichtet (CAPRIOTTI 1957a), konnte ich aus 16 schwedischen Bodenproben 10 Hefen isolieren, von denen 3 zu neuen Arten gehören. Es handelt sich dabei um die bereits beschriebene *Torulaspora nilssoni* nov. spec. (CAPRIOTTI 1957b) sowie um eine neue „*Candida*“, die ich nächstens beschreiben werde, und um eine Art, die ich zu Gattung *Debaryomyces* gestellt habe und die in dieser Veröffentlichung behandelt wird. Für diese Art schlage ich den Namen *Debaryomyces castellii* vor, zu Ehren des Professors TOMMASSO CASTELLI, des Direktors des „Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università di Perugia Italia“.

Beschreibung

Herkunft der Stämme: 32 Stämme wurden aus Boden von Ultuna (Uppland Schweden) isoliert und untersucht. Es handelt sich um mit Getreide und Kohlen bebauten Boden, der keineswegs erst neuerdings aufgebrochen wurde; er ist lehmig, hat den pH-Wert 5,6—6,7, und enthält 0–6% CaCO_3 .

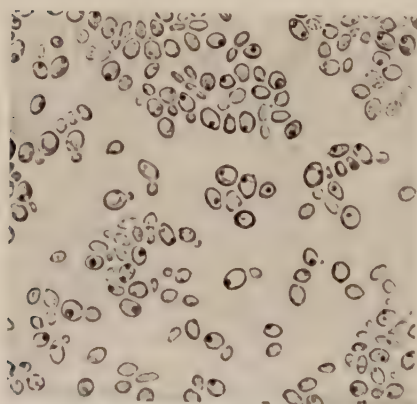


Abb. 1. *Debaryomyces castellii* nov. spec. ($\times 500$).
Nach 3 Tagen auf Würze-Agar

Untersuchungstechnik: Nach LODDER u. KREGER VAN RIJ (1932) außer bei den Zuckerassimilationsproben, für die gekochter und gewaschener Agar benutzt wurde (CAPRIOTTI 1955a, 1955b).

Wachstum in Malzabsud und Traubenmost: Nach drei Tagen bei 25° C hat sich eine üppige, weiße, undurchsichtige nach oben drängende, also faltige Haut gebildet. Die Zellen der Trübung sind rund oder leicht elliptisch, in Haufen zusammenge-drängt, knospenbildend, und bestehen aus zahlreichen Elementen von 3 bis 10 μ . Nach 50 Tagen bei 22° C hat sich ein Ring, eine Haut und eine durchsichtige Flüssigkeit gebildet.

Wachstum auf Würze-Agar: Nach drei Tagen bei 25° C: runde, kugelförmige und auch elliptische Zellen, einzeln und knospenbildend, von (3–9) \times (3,2–10) μ (Abb. 1). -- Strichkultur: üppig, weiß-porzellanartig, leuchtend, aber

öfters auch undurchsichtig, mit nicht ganz glatter Oberfläche, die mit der Zeit zahlreiche kleine, punktförmige Erhöhungen aufweist. Nach 15–20 Tagen zeigt sich eine beachtliche Änderung der Form und besonders der Größe der Zellen: sie sind jetzt im allgemeinen rund und isodiametrisch, enthalten häufig eine Fettkugel und zeigen sozusagen das Bild von „*Pulcherrima*“. Überdies sind die Zellen von verschiedener Größe, denn es finden sich auch sehr große Zellen von 15–16 μ (Abb. 2).

An einer Stelle der Zellwand läßt sich häufig eine Art Rest der Membran beobachten. Im übrigen zeigt sich charakteristische Knospenbildung; die Mutterzelle hat 4–5 Knospen, manchmal auch mehr, die an nur einer Stelle lokalisiert sind. Es lassen sich aber auch noch andere Arten der Zellvermehrung beobachten. So können an entgegengesetzten Stellen der Zelle zwei Knospen auftreten, und manchmal bilden sich mehrere Knospen rings um die Mutterzelle herum.

Wachstum auf Kartoffel-Agar: Nach drei Tagen bei 25° C runde und ellipthische Zellen von (3–9) bzw. (3,2–10) μ , darunter lange und schmale Zellen, einzeln oder knospenbildend. — Strichkultur: Sehr üppig, weiß, platt, wenig leuchtend, Oberfläche uneben, Rand überstehend. Mit der Zeit weiß-cremeartige Farbe und zahlreiche, kleine Erhöhungen auf dem am weitesten nach oben stehenden Teil der Oberfläche.

Wachstum auf Karotten-Agar: Nach drei Tagen bei 25° C rundliche bis elliptische Zellen von (3–7,3) \times (3,2–7,8) μ , einzeln oder zu zweien. — Strichkultur: weißlich, platt, ausgedehnt, undurchsichtig. Oberfläche und Rand glatt.

Wachstum auf Bohnen-Agar: Nach drei Tagen bei 25° C rundliche oder leicht elliptische Zellen von (3–7) \times (3,2–7,5) μ , einzeln oder zu zweien, knospenbildend. — Strichkultur: Weißlich, erhöht, leuchtend, Oberfläche glatt oder leicht uneben, Rand glatt oder gewellt, üppig und glänzend.

Wachstum auf Kartoffel-Agar: Nach drei Tagen bei 25° C kugelförmige Zellen, rund oder elliptisch von (3–9) \times (3,2–10) μ . Mittlere Größe 5–6 μ . — Strichkultur: Reichlich, weiß-tabakbraun, leuchtend und glatt. Aussehen nach einem Monat unverändert.

Wachstum auf Fleisch-Agar: Nach drei Tagen bei 25° C keine Entwicklung. Objektträger-Kultur: Pseudomycel-Form (Abb. 3).

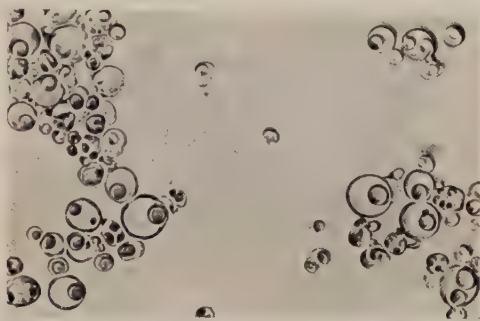


Abb. 2. *Debaryomyces castellii* nov. spec. (\times 500).
Nach 20 Tagen auf Würze-Agar

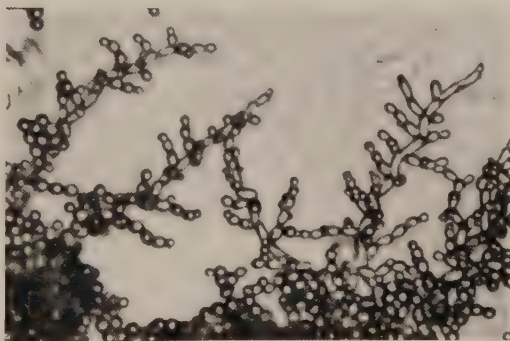


Abb. 3. *Debaryomyces castellii* nov. spec.
(\times 500). Objektträger-Kultur

Wachstum auf Würzelgelatine: Einzeln liegende Kolonien, weißlich, erhöht, eher klein und nicht fließend.

Gelatineverflüssigung: Oberflächliche, weit ausgedehnte Kolonie von weiß-schmutzig-gelblicher Farbe. Bei der Gelatineverflüssigung sehr spärliches Wachstum, Abspaltung und verspätetes Flüssigwerden.

Die Riesenkolonie auf Würzelgelatine ist nach einem Monat bei 18° C weißlich, porzellanartig, glatt und platt; manchmal bildet sie vereinzelt Krater, von denen,

allerdings nicht immer, erhöhte Strahlenbildungen ausgehen (Abb. 4).

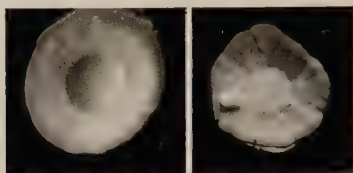


Abb. 4. *Debaryomyces castellii* nov. spec.
Riesenkultur nach 4 Wochen auf Würzelgelatine

Wachstum in Milch: Nach 35 Tagen bei 25° C keinerlei Veränderung.

Sporenbildung: Sie ist leicht und reichlich auf normalem Kulturboden. Sie erfolgt mit Asci von 1—2—3 und auch 4 Sporen, die sehr selten isogam oder parthenogen entstanden sind. Die Sporen sind rund, haben ein Ölkügelchen in der Mitte und warzige Episporien. Besonders in nicht ganz jungen Kulturen lassen sich die Warzen gut erkennen (Abb. 5).



Abb. 5. *Debaryomyces castellii* nov. spec. (× 1800).
Asci mit warzenbildenden Sporen auf Würze-Agar
nach 2 Monaten

Gärung: Die Proben wurden in Durham-Röhren und in Einhorn-Röhren durchgeführt. (In normalen Reagensgläsern mit 15 cem Substrat und 2 cem Fassungsvermögen des gasaufnehmenden Kölbchens, und außerdem in größeren Reagensröhren mit 60 cem Substrat und 20 cem Fassungsvermögen des gasaufnehmenden Kölbchens.) Am besten bewährte sich die Durham-Anlage in großen Reagensröhren mit gasaufnehmenden Kölbchen von 20 cem Fassungsvermögen. Das Ergebnis war: Glucose +; Galaktose —; Maltose + (schwach); Saccharose +; Raffinose $\frac{2}{3}$ (langsam); Inulin —; Dextrin — (oder selten positiv, aber sehr schwach).

Zuckerassimilation: Glucose +; Galaktose +; Maltose +; Saccharose +; Raffinose +; Lactose +.

Assimilation der Salze organischer Säuren ($p_H = 4,5$): Weinsäure —; Äpfelsäure ±; Citronensäure +; Bernsteinsäure +; Milchsäure +; Oxalsäure —; Brenztraubensäure ±.

Stickstoffassimilation: Kaliumnitrat —; Ammoniumsulfat +; Asparagin +. Äthylalkohol als Wachstumssubstrat: Wachstum sehr gut.

Arbutin-Spaltung: Positiv. Das erhaltene Substrat ist grau-bleifarben.

Gärungsvermögen: In normalem Traubenmost schwankt der Alkoholgehalt zwischen 0,55% und 1,22%. (Traubenmost von $p_H = 3,5$).

Betrachten wir zunächst die Unterschiede zwischen der von uns beschriebenen Art *Debaryomyces castellii* nov. spec. und den von STELLING-DEKKER und LODDER u. KREGER VAN RIJ erkannten Arten. *Debaryomyces castellii* nov. spec. unterscheidet sich von allen von STELLING-DEKKER erkannten Arten durch die Größe der Zellen, durch die Zahl der Sporen in den Asci, und durch die Fähigkeit, Zucker zu vergären. STELLING-DEKKER berichtet von keiner Art mit 4sporigen Asci und der Fähigkeit, Glucose, Maltose, Saccharose und Raffinose zu vergären.

Hinsichtlich der von LODDER u. KREGER VAN RIJ erkannten Arten geben wir folgendes Tabellenbeispiel, das eine leichte Gegenüberstellung

	<i>Debaryomyces castellii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Debaryomyces kloeckeri</i>	<i>Debaryomyces subglobosus</i>	<i>Debaryomyces vini</i>	<i>Debaryomyces nicotianae</i>
Größter Zellen in Würze	3—10	2,5—6,5	2,5—7	2,5—5,5	2,2—6	2,5—6
Größe d. Zellen auf Würze-Agar	2—10	2,2—6,5	1,5—7	1,7—4,5	2,2	2,5—5
Hautbildung	+	+	—	—	+	+
Anzahl der Sporen je Ascus	1-2-3-4	1—2	1—2	1	1-2-3-4	1
Warzenbildung der Sporen	+	+	+	+	—	+
Gärung:						
Glucose	+	+	+	+	—	+
Galaktose	—	±	—	—	—	±
Maltose	+	±	±	±	—	±
Saccharose	+	±	±	±	—	±
Raffinose	+ ^{2/3}	—	—	—	—	—
Lactose	—	—	—	—	—	—
Zuckerassimilation						
Glucose	+	+	+	+	+	+
Galaktose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	—	+	—	—
Lactose	+	+	—	+	—	—
Stickstoff-Assimilation						
Kaliumnitrat	—	—	—	—	—	—
Ammoniumsulfat	+	+	+	+	+	+
Arbutin-Spaltung	+	+	±	+	—	+
Äthylalkohol als Wach- stumssubstrat	+	+	+	+	+	+
Pseudomycel- entwicklung	+	+	+	+	+	±

zwecks Arteinteilung ermöglicht. Man sieht sofort, daß *Debaryomyces castellii* nov. spec. vollkommen verschieden ist von den von LODDER u. KREGER VAN RIJ aufgestellten Arten.

Debaryomyces castellii nova species unterscheidet sich also:

Von *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder durch die Größe der Zellen, durch die Fähigkeit, Raffinose zu vergären, durch die erhöhte Gärungsfähigkeit, durch die Fähigkeit, Asci auch mit 3—4 Sporen zu bilden, und durch die Fähigkeit, Lactose gut zu assimilieren.

Von *Debaryomyces kloeckeri* Guilliermond u. Peju durch die Größe der Zellen, durch die Fähigkeit, Raffinose zu vergären, durch die Fähigkeit, eine Haut zu bilden und Asci mit 3—4 Sporen hervorzubringen.

Von *Debaryomyces subglobosus* (Zach.) Lodder u. Kreger van Rij durch die Größe der Zellen, durch die Fähigkeit, Raffinose zu vergären, durch die Fähigkeit, eine Haut zu bilden und Asci mit 3—4 Sporen hervorzubringen.

Von *Debaryomyces nicotianae* Giovannozzi durch die Größe der Zellen, durch die Fähigkeit, Raffinose zu vergären, durch die Gärungsfähigkeit, durch die Fähigkeit, Asci mit 3—4 Sporen zu bilden und Lactose zu assimilieren.

Von *Debaryomyces vini* Zimmermann durch die Form und die Größe der Zellen, durch die Fähigkeit, Glucose, Maltose, Saccharose und Raffinose zu vergären, durch die Warzenbildung der Sporen und durch die Fähigkeit, Lactose zu assimilieren.

N. B. 15 Stämme von *Debaryomyces castellii* nova species werden in der Hefesammlung des Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica della Università di Perugia (Italia) konserviert und können auf Bestellung versandt werden.

Latina Diagnosis

Debaryomyces castellii nova species

Maltato in musto brevi sedimentum, album velamen, iterum ascendens, opacum, efficitur. Cellulae cum velamine, rotundae vel oviformes, acervatim, plurime gemmantes inveniuntur cum gemmulis (3—10) micron. — In agar maltato post 3 dies, 25° C, cellulae rotundae vel leviter oviformes (3—9) × (3,2—10) micron, singulae binaeve. Post 20 dies cellulae quamdam pinguis guttulam offerunt et pene omnes aequo diametro guadent licet mensurae varientur (15—16) micron. Observationi occurrit etiam typica gemmatio cristata id est cellula mater uno eodenque loco 4—5 gemmulas habens. Dantur etiam figurae plurimae multigemmantes. Gemmulae enim opposita in positione vel tota in superficie matris conspiciere possumus. — In agar maltato post unum mensem, 17° C, efficitur alba aerugo, aequa, perlucens, at persaepe opaca, superficie non bene levi. Ruente hora aerugo flava efficitur et possunt perplurimae et parvae prominentiae observari. — Pseudomycelium efficitur. Copula isogamica at saepe eterogamica cum 1—2—3 et etiam 4 rotundae ascospore verrucis et in medio pinguis guttulam circumferentes. — Dari potest et partogenetica efformatio asci. — Positive fermentatur glucosus, maltosus, saccharus et raffinosus $\frac{2}{3}$ partes. Assimilatur glucosus, galactosus, maltosus, saccharus, raphinosus at lactosus. Nitras kalicus non assimilatur. Assimilat vero sulphatum ammoniacum. — Minerali in medio cum alcohole aethylico bene augetur. — Arbutinum finditur. — In mediis cum glucoso format 0,55—1,62% alcoholis partes in volumine.

Literatur

CAPRIOTTI, A.: *Biochimica Applicata* 2, 1, 31 (1955a). — *Riv. Biol.* 47, 2, 209 (1955b). — *Annals of the Royal Agricultural College of Sweden* (1957a). — *Arch. Mikrobiol.* 28, 1, 247 (1957b). — LODDER, J., u. N. J. W. KREGER VAN RIJ: „The yeasts“, North Holland Publishing Company, Amsterdam (1952). — STELLING-DEKKER, N. M.: „Die Sporogenen Hefen“. *Verhandel. Koninkl. Akad. Wetenschap Aft. Natuurkunde* II 28, 1 (1931).

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen)

Untersuchungen über UV-Resistenz bei *Saccharomyces cerevisiae*

Von
K. SCHAUZ

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. September 1957)

Die letale und subletale Wirkung von UV-Strahlen ist schon öfters an den verschiedensten Objekten untersucht worden. Jedoch nur wenige Arbeiten liegen vor, die sich mit der Ausbildung einer Strahlenresistenz bei Mikroorganismen befassen.

WITKIN (1946) konnte durch Bestrahlung mit hoher UV-Dosis einen Stamm von *Escherichia coli* isolieren, der gegen die schädigende Wirkung von UV- und Röntgenstrahlen resistent war. ELLISON et al. (1950) bestätigten in ihren Untersuchungen das Ergebnis WITKINS. Mit einer anderen Methode haben GADEN et al. (1953) drei Stämme von *Escherichia coli* in ihrem Verhalten gegen Gamma-Bestrahlung geprüft. Dabei beobachteten sie nur bei zwei Stämmen die Ausbildung einer Strahlenresistenz, der dritte Stamm zeigte dagegen nach wiederholter Bestrahlung eine zunehmende Empfindlichkeit. Auch andere Forscher stellten nach mehrfacher Bestrahlung bei einigen Stämmen von *Escherichia coli* eine erhöhte Empfindlichkeit fest (HUBER 1952; ROEPKE et al. 1947).

Die Fähigkeit zur Ausbildung einer Strahlenresistenz wechselt offenbar von Stamm zu Stamm innerhalb derselben Bakterienart.

In allen erwähnten Arbeiten wird die beobachtete Strahlenresistenz durch Selektion von strahleninduzierten oder spontan auftretenden Mutanten erklärt. Nur GADEN deutet noch eine andere Möglichkeit der Ausbildung von Strahlenresistenz an, und zwar ausgehend von neueren Untersuchungen über die UV-Wirkung auf Mikroorganismen (vgl. HOLLAENDER 1952; RUBIN 1954; SIMONIS 1954). Danach sollen durch UV-Bestrahlung in der Zelle oder deren Umgebung schädigende Stoffe entstehen. Wie nun mehrere Forscher nachweisen konnten (CLAUS 1956; HINSHELWOOD 1946; WILD et al. 1954, 1955), ist eine Anpassung an verschiedene Hemmstoffe bei Bakterien und Hefen auch ohne Änderung ihrer genetischen Struktur möglich. Auf Grund dieser Befunde wäre auch eine nicht-mutative Resistenzbildung gegen UV-Bestrahlung durchaus denkbar.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst geprüft werden, wie weit bei Hefen überhaupt eine Strahlenresistenz auftritt; denn bisher wurde diese nur bei Bakterien beobachtet. Weitere Untersuchungen befassen sich mit der Frage, ob die Strahlenresistenz durch Selektion von resistenten Mutanten oder nicht-mutativ entsteht.

Methodik

Untersuchungsobjekt: Der in den Versuchen verwendete Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* wird schon seit einiger Zeit im Botanischen Institut der Universität Tübingen kultiviert. Er stammt von der Brauerei Leicht, Stuttgart-Vaihingen.

Stammkultur, Nährmedium: Von einer nach dem Lindnerschen Tröpfchenverfahren (vgl. JANKE 1946) isolierten Einzelzelle dieses Hefestammes wurde eine Kultur auf Malzagar angelegt, die als Ausgangsmaterial für alle Versuchsreihen diente. Für die eigentlichen Versuche mußte jedoch ein synthetisches Nährmedium gewählt werden. Als besonders geeignet erwies sich in Vorversuchen das Substrat nach Dr. BARTON WRIGHT (vgl. KILKENNY et al. 1951).

Das Nährmedium wurde dreimal 20 min in strömendem Dampf sterilisiert. Der pH-Wert betrug 4,8. Um eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch Substrat-adaptation auszuschalten, mußte der Hefestamm vor Ansetzen einer neuen Versuchsreihe auf dem synthetischen Nährmedium vorkultiviert werden, und zwar einmal auf festem Nährboden und zweimal in durchlüfteter Nährlösung. Wenn in der dritten Vorkultur eine Zelldichte von $5 \cdot 10^6$ je Milliliter erreicht war, wurde sie unter Beachtung folgender Voraussetzungen bestrahlt:

Bedingungen für reproduzierbare Bestrahlungsversuche: Nach Untersuchungen von BEAM et al. (1954) und SARACHEK et al. (1952) ist die Empfindlichkeit der Hefezellen gegen Bestrahlung stark von ihrem physiologischen Zustand abhängig. Sprossende Zellen sind viel resistenter als ruhende. Ein physiologisch nahezu einheitliches Material für Bestrahlungsversuche erhält man nach BEAM durch Aushungern der Zellen. Zu diesem Zweck brachte er die Hefezellen vor der Bestrahlung einige Zeit in eine 0,05 molare Phosphatlösung, in der nach GUNTER (1954) mindestens 6 Std die volle Lebensfähigkeit aller Zellen erhalten bleibt.

Herstellung der Zellsuspension: Die Hefezellen der zweiten Flüssigkeitsvorkultur wurden abzentrifugiert, zweimal in 0,05 molarer Kaliumdihydrogenphosphatlösung gewaschen und anschließend in dieser Lösung suspendiert. Um noch vorhandene Sproßketten von der Suspension abzutrennen, mußte sie, nachdem sich ein Teil der Zellen abgesetzt hatte, dekantiert werden. Nach 2—3 Std erfolgte die Bestrahlung. Hierbei war die Zellenzahl/Milliliter in allen Versuchen etwa $5 \cdot 10^5$.

Bestrahlung, Strahlungsquelle: Jeweils 4 ml dieser Suspension wurden in einem Glasschälchen (\varnothing 5,2 cm) auf einer rotierenden Scheibe bestrahlt. Dadurch konnte die Suspension ständig in Bewegung gehalten werden, was für eine gleichmäßige Verteilung der Strahlungsenergie auf alle Zellen unbedingt erforderlich war. Vor allem nach längerer Bestrahlung erhöhte sich etwas die Temperatur der Suspension. Nach OSTER (1934) ist dies jedoch ohne Einfluß auf die Versuchsergebnisse.

Als Strahlungsquelle diente eine Hg-Hochdrucklampe von der Quarzlampen G.m.b.H., Hanau (Typ S 500). Die Lampe konnte trotz ihres breiten spektralen Strahlungsbereiches in den Versuchen verwendet werden, da es hierbei nur auf die Wirkung des gesamten UV-Bereiches ankam, und die Frage nach der spezifischen Wirkung einzelner Spektrallinien nicht näher untersucht wurde. Eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch das über 410 m μ ausgestrahlte Blaulicht soll später diskutiert werden.

Strahlungsmessung: Die Bestrahlungsstärke des Gesamtspektrums wurde mit einer geeichten Thermosäule (Herstellerfirma: Kipp u. Zonen, Delft) und einem Multiflexgalvanometer (Lange, Berlin-Zehlendorf) gemessen. Sie war in allen Versuchen konstant und betrug $1,1 \cdot 10^5$ erg/sec/cm². Variiert wurde nur die Bestrahlungszeit. Schwankungen der Netzspannung konnten ausgeglichen werden, indem vor die Lampe ein regulierbarer Ohmscher Widerstand geschaltet wurde, kom-

biniert mit einem Voltmeter. Unmittelbar vor einer Bestrahlung wurde durch Veränderung dieses Widerstandes ein bestimmter Spannungswert eingestellt (200 Volt). Auch während der Bestrahlung auftretende Schwankungen der Spannung konnten auf diese Weise sofort ausgeglichen werden.

Nach der UV-Bestrahlung wurde bei Rotlicht (Beleuchtungsstärke 60 Lux) gearbeitet, um eine Photoreaktivierung der geschädigten Zellen zu verhindern.

Ansetzen von Flüssigkeitskulturen: Zur Untersuchung des Wachstums bestrahlter Hefekulturen in flüssigem Medium wurden 2 ml Nährlösung in Reagensröhrchen (Größe $1,5 \times 15,5$ cm) abgefüllt, sterilisiert und mit derselben Menge einer bestrahlten Hefesuspension beimpft. Die Bebrütung erfolgte bei 25°C in dem Wasserbad eines Superthermostaten von der Fa. Bühler, Tübingen. Als Maß für das Wachstum einer Kultur diente ihr Trübungsgrad, der in gewissen Zeitabständen nach der Beimpfung bestimmt wurde.

Trübungsmessung: Soll der Trübungsgrad als Maß für die Zelldichte einer Suspension verwendet werden, so müssen die einzelnen Zellen möglichst von gleicher Größe sein. Die Ausbildung von größeren Sproßketten mußte daher verhindert werden. Dies geschah, indem ein keimfreier Luftstrom durch die Kulturröhrchen geleitet wurde. Obwohl die Kulturflüssigkeit hierdurch ständig in Bewegung war, konnte ein Absetzen der Hefezellen nicht vollständig verhindert werden. Daher wurde jedes Röhrchen zum Zeitpunkt der Messung kräftig geschüttelt.

Die Trübungsmessungen wurden mit einem Pulfrich-Photometer von der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen, ausgeführt. An der Meßtrommel dieses Geräts kann die relative Trübung abgelesen werden, die in Prozenten das Intensitätsverhältnis zwischen dem Streulicht der Hefesuspension und dem eines Vergleichsglases darstellt. Da in allen durchgeführten Messungen dasselbe Vergleichsglas benutzt wurde, können die relativen Trübungswerte direkt miteinander verglichen werden.

Auswertung der Meßergebnisse: Nur in den Konzentrationsbereichen, in denen eine lineare Abhängigkeit der Zelldichte von der relativen Trübung besteht, kann diese direkt als Maß für das Wachstum (Zellvermehrung) einer Kultur gelten. Für die Auswertung der Meßergebnisse mußte daher eine Eichkurve aufgestellt werden.

Statistik: Soweit bei den Versuchsergebnissen der mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben ist, wurde er nach der Formel

$$\sigma_M = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^n (\bar{X} - X_n)^2}{n(n-1)}}$$

berechnet. In den graphischen Darstellungen konnte er häufig nicht eingezeichnet werden. Daher wird in diesen Fällen lediglich angegeben, ob der Unterschied zweier Stichprobenmittelwerte signifikant ist. Als Kriterium für die Signifikanz des Unterschiedes galt der dreifache mittlere Fehler.

V Versuchsergebnisse

1. Versuche mit Flüssigkeitskulturen

Zunächst sollte geprüft werden, ob bei *Saccharomyces cerevisiae* überhaupt eine Strahlenresistenz auftritt.

Dies geschah dadurch, daß ein Hefestamm wiederholt mit einer bestimmten Dosis bestrahlt wurde, und zwar jeweils vor Ansetzen einer neuen Subkultur. Nach jeder zweiten oder dritten Bestrahlung wurde untersucht, ob sich die UV-Empfindlichkeit der Hefezellen geändert hat, indem in gewissen Abständen vom Zeitpunkt der Bestrahlung an die relative Trübung der Flüssigkeitskulturen gemessen wurde.

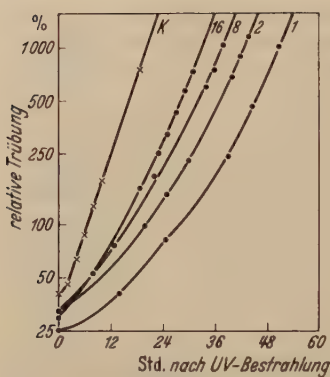


Abb. 1. *Saccharomyces cerevisiae*. Wachstumsverlauf von Kulturen nach der 1., 2., 8. und 16. UV-Bestrahlung. (Dosis 40 sec)

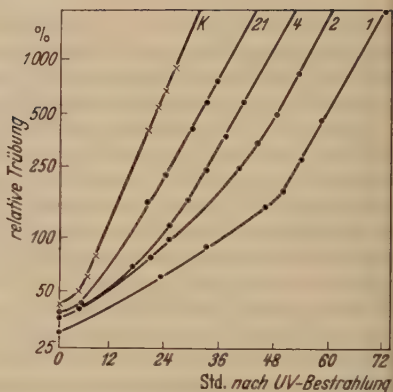


Abb. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. Wachstumsverlauf von Kulturen nach der 1., 2., 4. und 21. UV-Bestrahlung. (Dosis 60 sec)

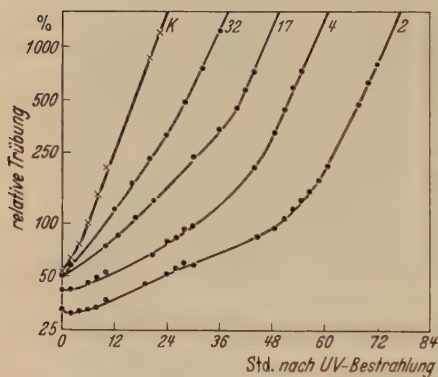


Abb. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. Wachstumsverlauf von Kulturen nach der 2., 4., 17. und 32. UV-Bestrahlung. (Dosis 80 sec)

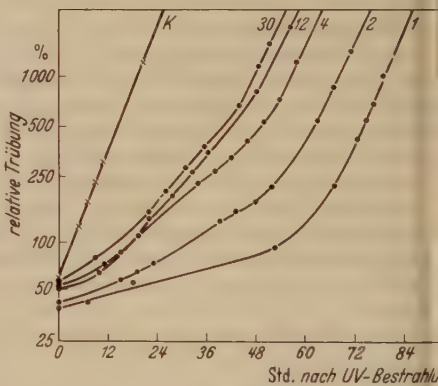


Abb. 4. *Saccharomyces cerevisiae*. Wachstumsverlauf von Kulturen nach der 1., 2., 4., 12. und 30. UV-Bestrahlung. (Dosis 100 sec)

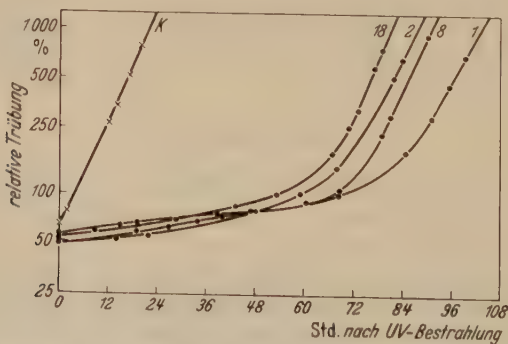


Abb. 5. *Saccharomyces cerevisiae*. Wachstumsverlauf von Kulturen nach der 1., 2., 8. und 18. UV-Bestrahlung. (Dosis 140 sec)

Die erhaltenen Trübungswerte in Abhängigkeit von der Zeit ergeben die in Abb. 1—5 dargestellten Wachstumskurven. Mit dieser Methode können auch geringe Änderungen der UV-Empfindlichkeit noch erfaßt werden.

Insgesamt sind fünf Versuchsserien durchgeführt worden, die sich lediglich durch die Dosis unterscheiden, mit der die einzelnen Subkulturen bestrahlt wurden. In der ersten Versuchsserie betrug die Bestrahlungszeit jeweils 40, bei den übrigen 60, 80, 100 und 140 sec. In allen Versuchen sind 5—6 Parallelkulturen angesetzt worden, deren Wachstumskurven zu einem Mittelwert zusammengefaßt werden konnten. Von jeder Versuchsserie sind einige solcher Mittelwertskurven in den Abb. 1—5 wiedergegeben.

Der Wachstumsverlauf einer Kultur ist durch die Länge der lag-Phase und die mittlere Generationsdauer, die aus der Steigung des logarithmischen Kurventeils errechnet werden kann, hinreichend charakterisiert. Daher wurden in den folgenden Untersuchungen nur die ersten beiden Abschnitte der Wachstumskurven bestimmt. Der genaue Wert der lag-Phase läßt sich oft nur sehr schwer ermitteln, da der Übergang von lag-Phase zu logarithmischer Phase häufig nicht scharf ist. Deshalb wird die Länge der lag-Phase (lag-Wert) in derartigen Untersuchungen meist dadurch bestimmt, daß der geradlinige Teil der Kurve rückwärts verlängert wird bis zum Schnittpunkt mit der Achsenparallelen, die durch den Anfangswert der Trübung geht (Abb. 6), (vgl. BECKHORN 1952; HINSHELWOOD 1946).

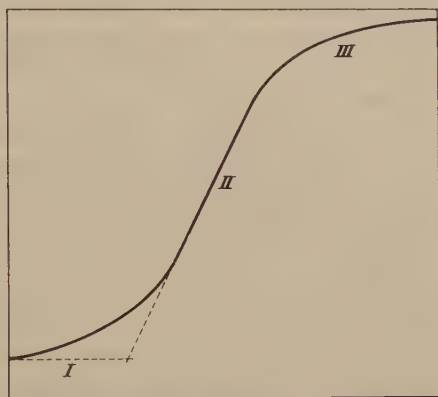


Abb. 6. Schema einer Wachstumskurve. I lag-Phase; II logarithmische Phase; III stationäre Phase

Ergebnisse. In Abb. 1—5 (Mittelwertskurven) sind von jeder Versuchsserie die Wachstumskurven einiger bestrahlter Subkulturen sowie je eine Kurve einer unbestrahlten Kontrollkultur (K) wiedergegeben.

Alle bestrahlten Kulturen zeigen gegenüber den Kontrollen eine erhebliche Verlängerung der lag-Phase, während sich hinsichtlich der mittleren Generationsdauer bestrahlte und unbestrahlte Kulturen nicht unterscheiden (die geradlinigen Kurventeile sind nahezu parallel).

In jeder Versuchsserie ist die Verlängerung der lag-Phase nach der ersten Bestrahlung am stärksten. Der lag-Wert wird kleiner mit zunehmender Anzahl von Bestrahlungen. Die Verkürzung der lag-Werte erfolgt aber nicht kontinuierlich von einer Bestrahlung zur anderen, sondern ist nach den ersten drei bis fünf Bestrahlungen besonders stark.

Weiterhin fällt auf, daß in der Versuchsserie, in der die einzelnen Subkulturen mit der höchsten Dosis (140 sec) bestrahlt wurden, die Abnahme der lag-Werte nach wiederholter Bestrahlung relativ gering ist. Außerdem

sind die Schwankungen zwischen den lag-Werten der einzelnen Versuche dieser Serie weitaus größer als in den übrigen.

Zur Deutung von Wachstumskurven UV-bestrahlter Kulturen. Die Wachstumskurve einer Kultur spiegelt nicht unbedingt den Wachstumsverlauf jeder Einzelzelle wider. Daher kann aus der Verlängerung des ersten Abschnittes der Wachstumskurve einer bestrahlten Kultur nicht ohne weiteres geschlossen werden, daß bei jeder einzelnen Zelle der Teilungsbeginn verzögert ist. Wenn nämlich ein Teil der Zellen durch die Bestrahlung abgetötet wird, und alle überlebenden Zellen sofort zu sprossen beginnen, so erhält man für das Wachstum dieser Kultur eine Kurve von ähnlichem Verlauf. Schließlich müßte man dieselbe Wachstumskurve erhalten, wenn ein Teil der Zellen der bestrahlten Kultur zwar abgetötet würde, die überlebenden Zellen jedoch nicht sofort, sondern erst nach einiger Zeit zu sprossen begannen.

Welcher dieser drei möglichen Fälle hier nun tatsächlich realisiert ist, soll in den folgenden Untersuchungen geklärt werden.

Kriterium für UV-Resistenz. Von der Entscheidung dieser Frage wird es abhängen, wie die in allen Versuchen beobachtete Verkürzung der lag-Phase mit zunehmender Anzahl der Bestrahlungen zu erklären sein wird. Denn nach dem eben Dargelegten gibt es hierfür zwei Möglichkeiten: Entweder erhöht sich der Prozentsatz der überlebenden Zellen, oder es wird die anfängliche Sprossungshemmung der lebensfähigen Zellen nach wiederholter Bestrahlung verringert.

Wie auch diese UV-Resistenz einer Kultur zustande kommen mag, immer wird sie angezeigt durch eine Verkürzung der lag-Phase. Damit erweisen sich die lag-Werte (bzw. deren Veränderung) als eindeutiges Kriterium für das Resistenzverhalten bestrahlter Kulturen.

Die wesentlichsten Ergebnisse dieser Versuchsgruppe können somit wie folgt zusammengefaßt werden: In allen fünf Versuchsreihen trat eine UV-Resistenz auf. Sie war jedoch nach Bestrahlung mit hoher Dosis (140 sec) geringer als bei kürzer bestrahlten Kulturen.

2. Versuche zur Bestimmung der Dosis-effekt-Kurven resistenter und normaler Stämme

Nach den dargestellten Versuchsergebnissen bleibt es ungeklärt, ob sich die resistenten Hefestämme von den normalen dadurch unterscheiden, daß bei ihnen nach gleicher Bestrahlung der Prozentsatz der abgetöteten Zellen kleiner ist, oder ob die Zellen der resistenten Stämme nur eine geringere Sprossungshemmung aufweisen als die normal empfindlichen Zellen. Dies sollte daher in den folgenden Untersuchungen näher geprüft werden.

Methode (Ergänzung für Plattenversuche): Mit dem Plattentestverfahren wurde der Prozentsatz der überlebenden Zellen nach Bestrahlung mit abgestuften Dosiswerten (20—300 sec) festgestellt, und zwar sowohl bei normal empfindlichen

als auch bei resistenten Stämmen. Dies geschah im einzelnen dadurch, daß die in der üblichen Weise für die Bestrahlung vorbereitete Zellsuspension auf mehrere Schälchen (\varnothing 5 cm) verteilt wurde. Jedes Schälchen enthielt 4,2 ml Suspension und wurde eine bestimmte Zeit (zwischen 20 und 300 sec) bestrahlt. Danach wurden die einzelnen, verschieden bestrahlten Zellsuspensionen verdünnt, bis in 0,1 ml (Impfmenge je Platte) nur noch etwa 200—500 überlebende Zellen enthalten waren. Der hierfür erforderliche Verdünnungsgrad mußte in Vorversuchen bestimmt werden. Mit jeder Suspension wurden 8—10 Platten beimpft. Ganz entsprechend ist mit unbestrahlter Suspension dieselbe Anzahl Kontrollplatten beimpft worden. Nach achttägiger Bebrütung in einem Thermostaten bei $25 \pm 0,5^\circ \text{C}$ konnten die überlebenden Zellen ausgezählt werden. Eine Hefezelle wurde dann als überlebend betrachtet, wenn sie eine mit bloßem Auge sichtbare Kolonie bildete. Die Dosisseffekt-Kurve des Normalstammes stellt eine Mittelwertskurve dar aus vier getrennt durchgeführten Versuchen.

Ergebnisse. Wie man aus der Darstellung in Abb. 7a—e ersehen kann, ist der Prozentsatz der überlebenden Zellen nach gleicher Bestrahlung bei allen resistenten Stämmen höher als beim Normalstamm.

Diese Unterschiede der Überlebensraten sind jedoch nicht in dem gesamten untersuchten Dosisbereich gleich groß. Nach einer Bestrahlungszeit von 200 sec nähern sich die Dosisseffekt-Kurven der normalen und resistenten Stämme, so daß die Differenzen nicht mehr signifikant sind. Aus der Abflachung aller Dosisseffekt-Kurven in diesem Bereich kann wohl geschlossen werden, daß auch nach langer UV-Bestrahlung noch einige Zellen ungeschädigt bleiben. Offenbar verhalten sich in dieser Hinsicht normale und resistente Stämme gleich.

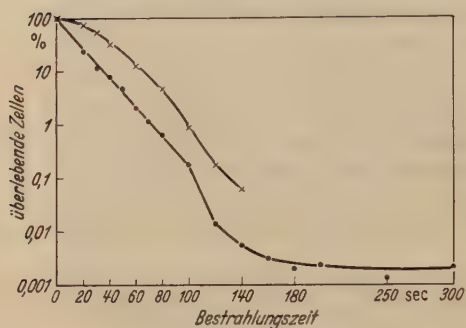
Dieses Verhalten nach extrem hohen UV-Dosen muß in besonderen Untersuchungen noch genauer geprüft werden, da es für eine Erklärung der Resistenzbildung gegen UV-Bestrahlung von entscheidender Bedeutung sein kann.

Wie bereits festgestellt wurde, ist die Resistenzbildung bei dem Stamm 140 nur gering. Daher ist es verständlich, daß der Unterschied zwischen der Dosisseffekt-Kurve dieses und des Normalstammes nur bis zu einer Bestrahlungszeit von 60 sec statistisch zu sichern ist, während bei allen übrigen Stämmen die Unterschiede zum Normalstamm bis zu einem Dosiswert von 200 sec signifikant sind.

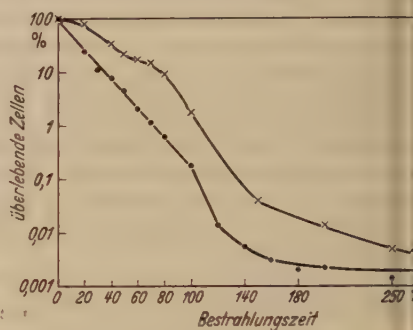
Bezüglich der Form der Dosisseffekt-Kurven zeigt sich zwischen den verschiedenen Stämmen ein beachtlicher Unterschied. Während die Kurve des Normalstammes im ersten Abschnitt exponentiell verläuft, sind die Kurven aller resistenten Stämme eindeutig „sigmoid“.

Auch WITKIN (1946) konnte diesen unterschiedlichen Kurvenverlauf resistenter und normaler Stämme bei *Escherichia coli* beobachten. Daraus wollte man ableiten, daß der resistente Stamm polyploid sein müsse. Denn bei polyploiden Hefen wurden gleichfalls sigmoide Dosisseffekt-Kurven festgestellt. (CALDAS et al. 1951; DE LONG et al. 1951.) Doch nach SARACHEK (1954) scheint der Ploidiegrad von Hefestämmen nur von geringem Einfluß auf ihre UV-Empfindlichkeit zu sein. Außerdem geben die angestellten morphologischen Untersuchungen keinerlei Anhaltspunkte für eine Deutung der Resistenzbildung durch Polyploidisierung des Normalstammes.

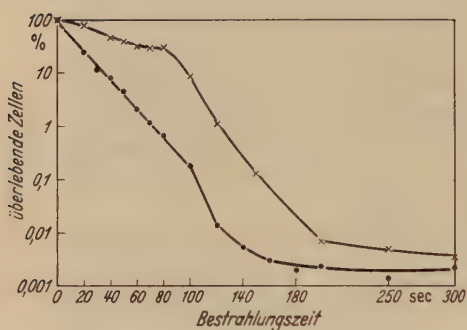
Der in allen Versuchen verwendete normal empfindliche Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* war nicht genetisch geprüft worden. Nach dem exponentiellen Verlauf seiner Dosis-effekt-Kurve muß er jedoch haploid sein; denn alle untersuchten



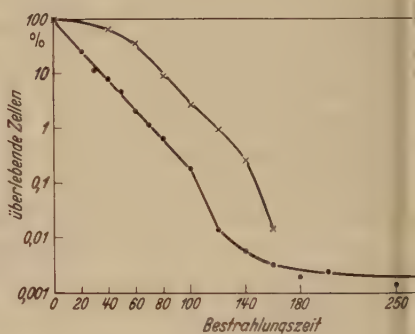
a



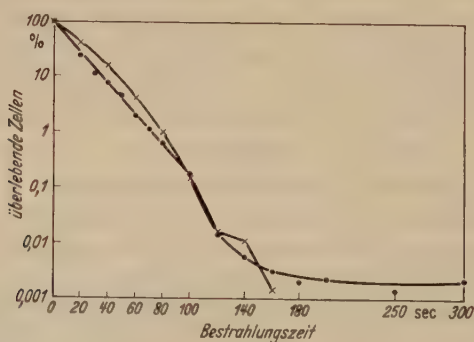
b



c



d



e

Abb. 7a—e. *Saccharomyces cerevisiae*. Dosis-effekt-Kurven: —•—•— des normalen Stammes; —x—x—x— des resistenten Stammes 40 (gewonnen durch wiederholte 40 sec lange UV-Bestrahlung); b des resistenten Stammes 60 (gewonnen durch wiederholte 60 sec lange UV-Bestrahlung); c des resistenten Stammes 80 (gewonnen durch wiederholte 80 sec lange UV-Bestrahlung); d des resistenten Stammes 100 (gewonnen durch wiederholte 100 sec lange UV-Bestrahlung); e des resistenten Stammes 140 (gewonnen durch wiederholte 140 sec lange UV-Bestrahlung)

diploiden Stämme zeigten „sigmoide“ Kurven (CALDAS et al. 1951; DE LONG et al. 1951; SARACHEK 1954).

Die sigmoiden Dosiseffekt-Kurven der resistenten Stämme weichen in einzelnen Abschnitten mehr oder weniger stark von einander ab. Der erste flache Teil der Kurve des Stammes 80 (gewonnen durch mehrmalige, 80 sec lange Bestrahlung) endet gerade bei einer Bestrahlungszeit von 80 sec (Abb. 7c). Dieser Stamm ist also gegen eine maximal 80 sec lange UV-Bestrahlung relativ unempfindlich. Schwächer ist diese Erscheinung bei den Kurven der Stämme 60 und 140 ausgeprägt, während die übrigen beiden Kurven überhaupt keine derartige Beziehung zeigen zwischen einer minimalen Empfindlichkeit und der Bestrahlungszeit, mit der sie zuvor wiederholt bestrahlt wurden.

3. Sprossungshemmung bei normalen und resistenten Hefestämmen

Nach Bestrahlung mit niedriger UV-Dosis wurde wiederholt eine Sprossungshemmung beobachtet (OSTER 1934; SCHREIBER 1934), die einige Zeit anhält. Danach beginnen die Zellen normal zu sprossen. Es besteht nun die Frage: Unterscheiden sich die verschiedenen Stämme auch hinsichtlich der Sprossungshemmung?

Zwar wurden in der ersten Versuchsgruppe für normale und resistente Kulturen nach Bestrahlung mit gleicher UV-Dosis unterschiedliche lag-Werte gefunden. Doch, wie bereits dort ausgeführt, kann man hieraus nicht ohne weiteres auf die lag-Werte der einzelnen Zellen (also Grad der anfänglichen Sprossungshemmung) schließen. Dieser Unterschied der lag-Werte normaler und resistenter Kulturen nach gleicher Bestrahlung könnte auch lediglich durch die verschiedenen Überlebensraten beider Stämme zustande kommen.

Die Methode blieb im wesentlichen unverändert. Zellen des Normalstammes wurden 40, 60, 80 und 100 sec bestrahlt. Jeder resistente Stamm wurde nur mit einem bestimmten Dosiswert bestrahlt, und zwar Stamm 40: 40 sec; Stamm 60: 60 sec usw. In jedem Versuch sind 8—10 Platten beimpft worden. Es wurde nicht wie bisher nur der Endwert der überlebenden Zellen festgestellt, sondern jeweils im Abstand von 12—24 Std ist die Anzahl der mit bloßem Auge sichtbaren Kolonien bestimmt worden. Nach 8 Tagen erhöhte sich die Kolonienzahl nicht mehr. Dieser Maximalwert wurde gleich 100 gesetzt und die zu den einzelnen Zeitpunkten ermittelten Kolonienzahlen hierauf bezogen (Abb. 8a—d).

Nach gleicher UV-Bestrahlung wird der Endwert der Kolonienzahl bei den resistenten Stämmen drei Tage früher erreicht als beim Normalstamm. Dies kann nur so erklärt werden, daß die Sprossungshemmung der kolonienbildenden Zellen des resistenten Stammes wesentlich geringer ist als die des Normalstammes. Bei den Kurven des Normalstammes ist aber nicht nur der Zeitpunkt gleich, zu dem der Endwert der Kolonienzahl erreicht wird, sondern auch der des ersten Auftretens sichtbarer Kolonien. Die Variationsbreite hinsichtlich der Sprossungshemmung, die ja gegeben ist durch den zeitlichen Abstand zwischen erstem und letztem Erscheinen sichtbarer Kolonien, ist in allen Versuchen

gleich groß und damit unabhängig von der Bestrahlungszeit. Danach kommen maximal gehemmte Zellen in nur kurz bestrahlten Kulturen ebenso vor wie solche mit geringer Sprossungshemmung nach längerer Bestrahlung (100 sec). Der Anteil stärker gehemmter Zellen erhöht sich mit zunehmender Bestrahlungszeit, wie aus dem Verlauf der Kurven in

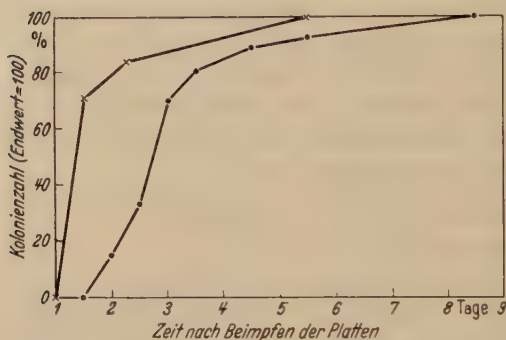


Abb. 8a

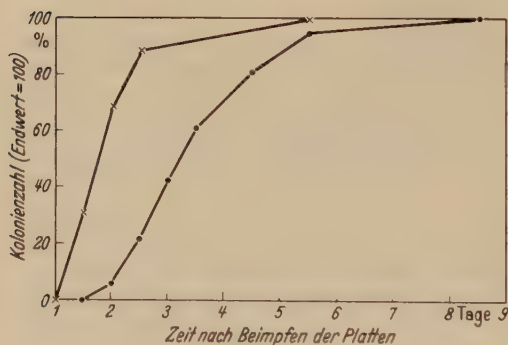


Abb. 8b

Abb. 8a—d. *Saccharomyces cerevisiae*.

×—×—×—× resistenter Stamm; — normaler Stamm. (Beide Stämme waren vor Beimpfen der Platten 40 sec a, 60 sec b, 80 sec c und 100 sec d bestrahlt worden)

Abb. 8a—d ohne weiteres zu ersehen ist.

Bei einem Vergleich der Kurven der resistenten und normalen Stämme fällt zunächst auf, daß die Variationsbreite bezüglich der UV-Empfindlichkeit in resistenten Kulturen wesentlich geringer ist. Maximal sprossungsgehemmte Zellen (erst nach 7 Tagen sichtbare Kolonien bildend) kommen offenbar bei diesen Stämmen nicht vor.

4. Beziehungen zwischen letaler und subletaler UV-Wirkung

Die resistenten Stämme zeigten nach gleicher UV-Bestrahlung sowohl eine größere Überlebensrate als auch eine geringere Sprossungshemmung als die normal empfindlichen Zellen.

Man könnte sich nur vorstellen, die letale und subletale (Sprossungshem-

mung) Wirkung der UV-Strahlen erfolge über zwei verschiedene, voneinander unabhängige Mechanismen und die resistenten Stämme wären gegen beide Wirkungsmechanismen weniger empfindlich. Andererseits aber könnten Sprossungshemmung und Abtötung durch denselben Mechanismus bewirkt werden, etwa in der Art, daß extrem sprossungsgehemmte Zellen absterben, ehe die Hemmung aufgehoben ist.

In Versuchen über Resistenzbildung gegen Hemmstoffe wurde dieser Fall beobachtet (BASKETT et al. 1951; HINSHELWOOD 1946). Einige Befunde aus Unter-

suchungen über die morphologische Wirkung der UV-Strahlen sprechen ebenfalls für diese Auffassung.

Da extrem sprossungsgehemmte Zellen nur beim Normalstamm vorkommen, ist es verständlich, daß dieser nach gleicher Bestrahlung weniger überlebende Zellen aufweist als die resistenten Stämme. Normaler und resistenter Stamm würden sich danach lediglich durch den Grad der Sprossungshemmung unterscheiden.

5. Versuche mit extrem hoher UV-Dosis

Weiterhin war nun zu prüfen, ob die resistenten Stämme durch Selektion von Mutanten oder nicht-mutativ entstanden sind.

Wie bereits festgestellt, werden die Dosiseffekt-Kurven der resistenten und normalen Stämme im Bereich hoher UV-Dosen flacher und nähern sich der Abszisse (Abb. 7a—c). Für eine Erklärung könnte man zunächst annehmen, daß in einer Kultur vorhandene strahlenresistente Mutanten sich gerade in ihrem Verhalten gegen hohe UV-Dosen von normal empfindlichen Zellen unterscheiden. Ob die nach starker Bestrahlung überlebenden Zellen tatsächlich resistente Mutanten sind, läßt sich experimentell ohne weiteres nachweisen.

In mehreren Versuchen wurden insgesamt $3,98 \cdot 10^7$ Zellen 300 sec (Bestrahlungsstärke: $2,0 \cdot 10^5$ erg/sec/cm²) bestrahlt und in der üblichen Weise auf Platten geimpft. Hiervon vermochten nur 22 Zellen sichtbare Kolonien zu bilden. Jede einzelne dieser Kolonien wurde auf UV-Resistenz geprüft, indem jeweils die Überlebensraten nach 20, 40 und 80 sec langer Bestrahlung bestimmt wurden. Die nach 80 sec langer UV-Bestrahlung erhaltenen Werte sind in Tab. 1 wiedergegeben.

Zum Vergleich wurden die Überlebensraten des normalen und eines strahlenresistenten Stammes (80) nach 80 sec langer UV-Bestrahlung angeführt. Die Differenz zwischen dem Wert des resistenten Stammes und

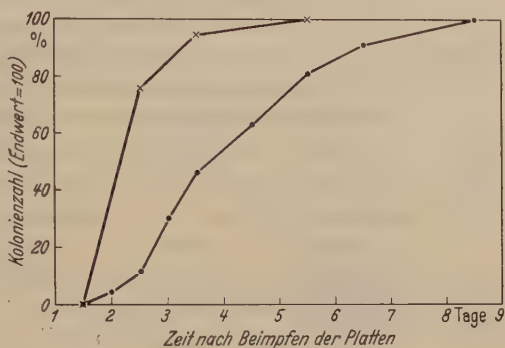


Abb. 8 c

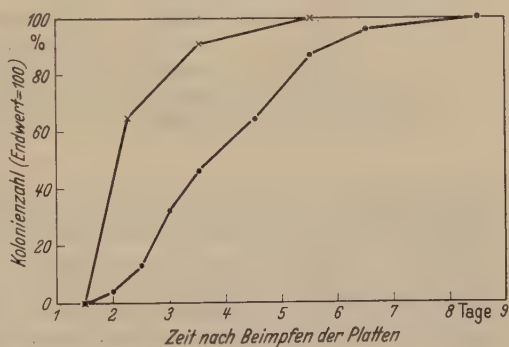


Abb. 8 d

den für die 22 Kolonien erhaltenen Überlebensraten ist so groß, daß es sich bei diesen nach extrem langer Bestrahlung noch überlebenden Zellen unmöglich um strahlenresistente Mutanten handeln kann; denn solche müßten eine maximale Resistenz zeigen.

Tabelle 1. *Saccharomyces cerevisiae*, 80 sec lange UV-Bestrahlung überlebende Zellen (in %)

a) des Normalstammes, b) des resistenten Stammes 80, c) von 22 Stämmen, die von überlebenden Zellen nach langer UV-Bestrahlung angelegt wurden

Stamm	Überlebende Zellen (%)	Stamm	Überlebende Zellen (%)
a) Normal-Stamm	0,66	Nr. 10	0,27
b) resist. Stamm 80	29,3	„ 11	0,53
c) Stamm		„ 12	0,26
Nr. 1	0,67	„ 13	0,88
„ 2	0,48	„ 14	0,40
„ 3	0,77	„ 15	0,52
„ 4	0,48	„ 16	0,48
„ 5	0,97	„ 17	0,73
„ 6	0,19	„ 18	0,80
„ 7	0,31	„ 19	0,50
„ 8	0,38	„ 20	0,68
„ 9	0,61	„ 21	0,78
		„ 22	0,27

Mit der hier angewandten Methode ist es WITKIN (1946) gelungen, Kolonien von *Escherichia coli* mit maximaler UV-Resistenz zu isolieren. Es dürfte sich daher in ihrem Falle wohl eindeutig um Mutanten handeln.

ENGELHARD et al. (1950), die ebenfalls nach langer UV-Bestrahlung noch überlebende und kolonienbildende *Escherichia coli*-Zellen auf ihre UV-Empfindlichkeit prüften, konnten bei diesen keine erhöhte UV-Resistenz feststellen. Sie nahmen daher an, „es müsse eine von der Vorbehandlung unabhängige Wahrscheinlichkeit für UV-Resistenz bestehen“.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die nach langer UV-Bestrahlung noch überlebenden Zellen bietet sich, wenn man berücksichtigt, daß die Abflachung der Dosis-effekt-Kurven anscheinend nur bei Verwendung von Hg-Hochdrucklampen mit breiterem Spektralbereich auftritt. Da diese Lampen auch noch über 350 m μ ausstrahlen, könnten hierdurch einige UV-geschädigte Zellen bereits photo-reaktiviert werden. HELMKE (1954) z. B. erhielt eine Photoreaktivierung bei *Escherichia coli*, indem er gleichzeitig UV 254 m μ und solches über 350 m μ bot.

6. UV-Empfindlichkeit der beim Plattentest zuerst erscheinenden Kolonien

Als die Sprossungshemmung untersucht wurde, konnte bezüglich der lag-Phase der einzelnen Zellen einer normal empfindlichen Kultur eine größere Variationsbreite beobachtet werden. Während nach voraus-

gehender UV-Bestrahlung die ersten mit bloßem Auge sichtbaren Kolonien bereits nach eineinhalb Tagen auftraten, erschienen die letzten erst nach etwa einer Woche (Abb. 8a—d).

Nimmt man nun an, eine Hefekultur setze sich vornehmlich aus normalen Zellen und einem kleineren Teil UV-resistenter Mutanten zusammen, so müssen diese, sollen sie nach UV-Bestrahlung in einer Kultur angereichert werden, eine kürzere lag-Phase besitzen als die normalen Zellen, d. h. die bereits nach ein bis eineinhalb Tagen auftretenden Kolonien müßten aus Mutanten bestehen mit maximaler Resistenz.

In mehreren Versuchen wurde die UV-Empfindlichkeit der nach 80 bzw. 100 sec langer Bestrahlung zuerst erscheinenden Kolonien geprüft, und zwar auf dieselbe Weise wie in den Untersuchungen des vorangehenden Abschnittes. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche stimmen weitgehend überein. Daher sollen nur die Daten eines Versuches wiedergegeben werden, in dem die ersten sieben Kulturen geprüft wurden. Die Überlebensraten dieser sieben Kolonien sind zusammen mit den entsprechenden Werten eines normalen und resistenten Stammes (80) in Tab. 2 dargestellt.

Tabelle 2. *Saccharomyces cerevisiae*, 80 sec lange UV-Bestrahlung überlebende Zellen (in Prozent)

a) des Normalstammes, b) des resistenten Stammes 80,
c) der „zuerst erscheinenden Kolonien“ (nähere Erläuterung im Text)

a) Normal- stamm	b) resi- stenter Stamm 80	c) Stamm Nr.						
		1	2	3	4	5	6	7
0,66	29,3	0,38	0,87	0,74	0,24	0,11	0,20	0,41

Beim Vergleich mit den Werten des resistenten Stammes ergibt sich eindeutig, daß keine dieser geprüften Kolonien eine nennenswerte UV-Resistenz besitzt. Es kann sich also hierbei nicht um Mutanten handeln.

Sollten diese Zellen mit der geringsten lag-Phase bei der UV-Bestrahlung nicht oder nur schwächer getroffen worden sein als die übrigen Zellen, so müßte der prozentuale Anteil der nach ein bzw. eineinhalb Tagen erscheinenden Kolonien bei normalem und resistentem Stamm nach einer bestimmten UV-Dosis gleich groß sein. Dies trifft aber nicht zu (vgl. Abb. 8a—d).

8. Morphologische Wirkungen durch UV-Bestrahlung

Es wurde wiederholt beobachtet, daß nach Bestrahlung mit UV bei Hefen abnormal große Zellen auftreten (OSTER, 1934; SCHREIBER, 1934; TOWNSEND et al., 1953). Ähnliche „Riesenformen“ kommen offenbar auch bei bestrahlten Bakterien vor (ENGELHARD et al., 1950; SIMONIS, 1953; WITKIN, 1946; WYSS et al., 1950). Nach BAUCH (1943) handelt es sich bei dieser „Riesenzellbildung“ um eine allgemeine Erscheinung, die nach UV-, Röntgen- und Gamma-Bestrahlung bei den verschiedensten Mikroorganismen beobachtet werden kann.

Die Entstehung solcher Riesenformen könnte nach ERRERA (1953) durch eine Hemmung der DNS-Synthese und damit der Teilungsfähigkeit erklärt werden,

während gleichzeitig die Wachstumsprozesse normal weiterlaufen. Diese Vorstellung wird gestützt durch Untersuchungen von TOWNSEND et al. (1953) und eigene Beobachtungen, wonach solche „Riesenformen“ nur auftreten, wenn genügend Kohlenstoff- und Stickstoffquellen in der Nährlösung vorhanden sind.

Die Frage nach dem weiteren Verhalten dieser „Riesenzellen“ wird unterschiedlich beantwortet. BAUCH (1943) und LATARJET (1952) beobachteten neben Zellen, die ihre Teilungsfähigkeit gänzlich verloren hatten, solche, die nach einiger Zeit wieder normal zu sprossen begannen. TOWNSEND et al. (1953) berichten dagegen, daß fast alle „Riesenzellen“ teilungsunfähig waren. Nur wenige führten noch maximal zwei bis drei Teilungen durch.



Abb. 9. Riesenzelle, nur einen schlauchartigen Fortsatz austreibend. (630fach vergr.)



Abb. 10. Riesenzelle mit einer Tochterzelle; beide durch einen Plasmanschlauch verbunden. (630fach vergr.)



a



b



c

Abb. 11 a—c. Riesenzellen, noch weitere Tochterzellen ausbildend. (630fach vergr.)

Aus den erwähnten Arbeiten geht nicht klar hervor, ob sich alle „Riesenzellen“ einer bestrahlten Kultur gleich verhalten, oder ob hinsichtlich ihres Schädigungsgrades eine größere Variabilität besteht. Dies ist aber für eine Deutung der beobachteten Resistenzbildung von Interesse. Daher sollte diese Frage in den folgenden Untersuchungen näher geprüft werden.

In der üblichen Weise wurden Hefekulturen 20, 40, 60, 80 und 100 sec bestrahlt und anschließend in gewissen Zeitabständen mikroskopisch geprüft. Der prozentuale Anteil der „Riesenzellen“, die maximal das Achtfache der Normalgröße erreichten, war um so höher, je kürzer die betreffende Kultur bestrahlt wurde.

In der 100 sec bestrahlten Kultur traten nur einzelne „Riesenzellen“ auf, die alle offenbar ihre Teilungsfähigkeit verloren hatten, denn die Entstehung einer Tochterzelle konnte nie beobachtet werden. Einige Zellen trieben allerdings einen schlauchartigen Fortsatz aus (Abb. 9).

Nach einer Bestrahlungszeit von 60 sec bildeten die meisten dieser „Riesenformen“ eine Tochterzelle, die stets durch einen Schlauch mit der Mutterzelle verbunden blieb (Abb. 10). Nur vereinzelt erfolgten 1—2 weitere Teilungen (Abb. 11 a und b).

Die nur 20 und 40 sec bestrahlten Kulturen enthielten auch „Riesenzellen“, die größere Sproßketten und schließlich auch Kolonien bildeten (Abb. 11 c). Stets war die erste Tochterzelle mit der Ausgangszelle durch einen Schlauch verbunden. Die ersten Tochterzellen waren der Mutterzelle meist noch ähnlich. Nach einiger Zeit konnten aber auch völlig normale Zellen abgetrennt werden. Dieser Rückschlag zur normalen Zellgröße wurde jedoch nicht in allen Fällen beobachtet.

Ob die „Riesenzellen“ einer bestrahlten Kultur teilungsfähig sind oder nicht, hängt offenbar weitgehend von der angewendeten UV-Dosis ab. Das unterschiedliche Ergebnis von TOWNSEND et al. (1946) und BAUCH (1943) läßt sich wohl dadurch erklären, daß beide Autoren mit verschiedenen Dosiswerten bestrahlten und diese in ihren Versuchen nicht variierten.

Neben Riesenzellen wurden in bestrahlten Kulturen auch normale und „geschrumpfte“ Zellen beobachtet. Der Anteil der Zellen normaler Größe war um so höher, je kürzer die betreffende Kultur bestrahlt wurde. Die „geschrumpften“ Zellen traten vor allem in länger bestrahlten Kulturen auf. Suspendiert man bestrahlte Hefezellen in einer Acridinorangelösung, so fällt auf, daß die „geschrumpften“ Hefezellen schon kurze Zeit nach der Bestrahlung erheblich mehr Farbstoff speichern als die übrigen Zellen, was nach STRUGGER (1944) darauf hinweist, daß die „geschrumpften“ Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits tot sind. Dagegen waren auch teilungsunfähige „Riesenzellen“ einige Tage nach der Bestrahlung noch lebend.

Nach all den erwähnten Beobachtungen scheinen in einer bestrahlten Kultur fließende Übergänge zu bestehen zwischen morphologisch normalen, mehr oder weniger großen (Riesenformen) und schließlich „geschrumpften“ Zellen, und zwar sind diese offenbar maximal geschädigt, während die Zellen normaler Größe nur eine Sprossungshemmung aufweisen.

Diskussion der Ergebnisse

a) Nach neueren Untersuchungen scheint die UV-Wirkung auf lebende Zellen über mehrere, möglicherweise voneinander unabhängige Mechanismen zu erfolgen (vgl. SIMONIS 1953 u. 1955, und die dort angegebene Literatur). Diskutiert werden vor allem eine direkte Strahlenwirkung, d. h. die Annahme, der Absorptionsort sei identisch mit dem Wirkungs-ort, und eine indirekte Strahlenwirkung, also die Annahme einer Schädigung der Zelle durch primär gebildete Giftstoffe irgendwelcher Art.

b) Auf Grund dieser Vorstellung der UV-Wirkung können sich normale und strahlenresistente Stämme einmal dadurch unterscheiden, daß diese gegen alle Wirkungsmechanismen weniger empfindlich sind als jene, oder es wird nur gegen eine bestimmte UV-Wirkung eine Resistenz

ausgebildet, während durch die übrigen Wirkungsmechanismen beide Stämme in gleicher Weise geschädigt werden.

Wie Untersuchungen über Photo- und Wärmereaktivierung zeigten, ist bei *Escherichia coli* diese zweite Möglichkeit realisiert (ANDERSON 1949; STEIN et al. 1953). Ob dies auch für *Saccharomyces cerevisiae* zutrifft, konnte nicht eindeutig entschieden werden.

c) Die Ergebnisse des zweiten Teils der Untersuchungen lassen sich mit der Mutations- und Selektionstheorie nicht erklären. Dies gelingt auch nicht durch zusätzliche Annahmen, etwa der Art, daß die Ausbildung der Strahlenresistenz über mehrere Mutationsschritte erfolge. Denn auch in diesem Falle müßten sich bezüglich der UV-Empfindlichkeit Unterschiede ergeben zwischen dem Normalstamm und den im Plattentest zuerst erscheinenden Kolonien. Ferner könnte die besonders starke Resistenzsteigerung nach den ersten Bestrahlungen hierdurch schwer erklärt werden.

Es sei auch nochmals auf das in mehrfacher Hinsicht unterschiedliche Verhalten zwischen der strahlenresistenten Mutante von *Escherichia coli* (WITKIN 1946) und den resistenten Stämmen von *Saccharomyces cerevisiae* hingewiesen.

d) Die Resistenzbildung dürfte wohl eher durch irgendeine Modifikation im Cytoplasma bedingt sein, die sich nachträglich stabilisiert, also zur Dauermodifikation wird, und daher viele Zellgenerationen hindurch erhaltenbleiben kann. Voraussetzung hierfür wäre, daß mindestens ein Mechanismus des UV-Wirkungssystems im Cytoplasma angreift und dort etwa einen toxischen Stoff bildet. Eine solche Vorstellung würde gestützt durch die Untersuchungen von ALDOUS et al. (1952) und GIESE et al. (1947).

Welches Strahlengift in der Zelle nun tatsächlich entsteht, konnte noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es wurde jedoch wiederholt die Vermutung geäußert, daß es sich hierbei um organische Peroxyde handeln könne (STEIN et al. 1955). Auch einige Versuchsergebnisse LATARJETS (1952) weisen in diese Richtung. Nach einer Vorstellung ABRAHAMS (1953) könnte die Zelle möglicherweise adaptiv ein Enzym bilden, das diese toxische Substanz abzubauen vermag.

Danach wäre also letztlich die Entstehung einer Strahlenresistenz durch eine adaptive Enzyymbildung erklärbar.

e) Wie bei der Ermittlung der Dosiseffekt-Kurven festgestellt wurde, bestehen bei einigen dieser Kurven, allerdings nur andeutungsweise, gewisse Beziehungen zwischen maximaler Resistenz und der Dosis, mit der die betreffende Kultur zuvor wiederholt bestrahlt wurde (Abb. 8b, 8c u. 8e).

Diese Beobachtungen können vielleicht mit Untersuchungsergebnissen über Hemmstoffresistenz in Zusammenhang gebracht werden. Danach

bestehen allgemein deutliche Beziehungen zwischen Resistenzgrad und der Hemmstoffkonzentration, bei der die betreffenden Stämme mehrfach kultiviert wurden, und zwar derart, daß die Bakterienstämme gegen diejenige Hemmstoffkonzentration maximal resistent sind, bei der sie zuvor wiederholt kultiviert wurden (CLAUS 1956; EAGLE et al. 1952).

Dieses Verhalten wird verschiedentlich als besonderer Hinweis auf eine nicht-mutative Resistenzbildung gewertet (DEAN et al. 1953; MANDELSTAM et al. 1952).

f) Wie bereits eingangs erwähnt, wurde in allen mit Bakterien durchgeführten Untersuchungen die Ausbildung von Strahlenresistenz durch Selektion von Mutanten erklärt. Es müßte in weiteren Versuchen geprüft werden, ob etwa im Gegensatz zu dem bei Hefen Festgestellten die Strahlenresistenz bei Bakterien vorwiegend mutativ entsteht. Das wäre durchaus denkbar, nähme man an, der Strahlenschutz, den der Kern bzw. die Nucleoide durch das Plasma erfahren (vgl. hierzu MAZIA et al. 1950), sei bei Hefen größer als bei Bakterien. Daß das Cytoplasma bei UV-Bestrahlung von Hefen allgemein eine größere Rolle spielt als bei Bakterien, geht u. a. aus den bereits erwähnten Arbeiten von ALDOUS et al. und GIESE et al. hervor.

g) In Untersuchungen über Hemmstoffresistenz wird gelegentlich darauf hingewiesen, daß die beiden Erklärungsmöglichkeiten für eine Resistenzbildung sich gegenseitig nicht auszuschließen brauchen, d. h. nicht nur bei verschiedenen Organismen, sondern bei ein und demselben Stamm wäre die Entstehung einer Resistenz mit beiden Theorien erklärbar. Und zwar soll eine Resistenz gegen gerade noch erträgliche Hemmstoffkonzentrationen in erster Linie nicht-mutativ (adaptiv) entstehen, während sie bei stärkeren Hemmstoffkonzentrationen wohl vorwiegend durch Selektion von Mutanten zustande käme (vgl. GIBSON et al. 1951; STANIER, 1953). Wenn nur nicht-mutativ Resistenz ausgebildet würde, müßte der Grad der erreichten Resistenz um so größer sein, je geringer die Hemmstoffkonzentration bzw. bei Strahlenversuchen die UV-Dosis ist, der die einzelnen Subkulturen einer Versuchsserie wiederholt ausgesetzt waren.

In allen Versuchen (auch in denen, die mit anderen Objekten durchgeführt wurden) war die Resistenzbildung bei den mit der höchsten UV-Dosis durchgeführten Versuchsserien geringer als bei den kürzer bestrahlten.

Zusammenfassung

1. Bei *Saccharomyces cerevisiae* konnte nach wiederholter 40, 60, 80, 100 und 140 sec langer UV-Bestrahlung eine Resistenzsteigerung beobachtet werden. Diese ist nach 140 sec langer Bestrahlung geringer als bei den kürzer bestrahlten Versuchsserien.

2. Die auf diese Weise isolierten strahlenresistenten Hefestämme zeigten nach gleicher Bestrahlung in einem Dosisbereich zwischen 20 und 300 sec eine höhere Überlebensrate als der Normalstamm.

3. Die Dosiseffekt-Kurven aller resistenten Stämme verlaufen sigmoid, die des Normalstammes jedoch exponentiell.

4. Nach 40, 60, 80 und 100 sec langer UV-Bestrahlung ist die Sprossungshemmung bei den resistenten Stämmen schwächer als beim Normalstamm.

5. Die Variationsbreite hinsichtlich der lag-Werte der einzelnen Zellen in einer bestrahlten Kultur ist bei resistenten Stämmen ebenfalls geringer als bei den normal empfindlichen.

Die Zellen mit der kürzesten lag-Phase, die also die „zuerst erscheinenden“ Kolonien bilden, sind keine strahlenresistenten Mutanten; denn sie besitzen keine maximale Resistenz.

6. Auch die nach extrem hoher UV-Dosis noch überlebenden und koloniebildenden Zellen zeigen keine geringere UV-Empfindlichkeit als der Normalstamm. (Sie können also keine strahlenresistenten Mutanten sein.)

7. Bei der mikroskopischen Betrachtung bestrahlter Hefekulturen konnten „Riesenformen“ beobachtet werden, die im Extremfalle das Achtfache der Normalgröße erreichen und alle eine mehr oder weniger starke Sprossungshemmung aufweisen. Daneben traten „geschrumpfte“ (momentan abgetötete) Zellen auf. Es bestehen kontinuierliche Übergänge zwischen maximaler und minimaler UV-Schädigung.

8. Nach den Versuchsergebnissen ist es sehr unwahrscheinlich, daß die beobachtete UV-Resistenz durch Selektion von resistenten Mutanten entsteht. Die Möglichkeiten einer nicht-mutativen Resistenzbildung werden diskutiert.

Für die Anregung zu der vorliegenden Untersuchung möchte ich Herrn Professor Dr. E. BÜNNING herzlich danken.

Literatur

- ABRAHAM, E. P.: The development of drug resistance in microorganisms. *Adaptation in micro-organisms*. S. 201—234. Cambridge 1953. — ALDOUS, I. G., and D. K. R. STEWART: The effect of uv-radiation upon enzymatic activity and viability of yeast cell. *Canad. J. Med. Sci.* **30**, 561—570 (1952). — ANDERSON, E. H.: Reactivation of ultraviolet irradiated bacteria. *Amer. J. Bot.* **36**, 807 (1949).
- BASKETT, A. C., and C. N. HINSHELWOOD: The mechanism of the training of *Bact. lactis aerogenes* to d-arabinose. *Proc. Roy. Soc. (Lond.)* **139**, 58—73 (1951). — BAUCH, R.: Die Erbllichkeit der durch Radiumbestrahlung bei der Hefe ausgelösten Riesenzellbildung. *Arch. Mikrobiol.* **13**, 352—364 (1943). — BEAM, C. A., R. R. MORTIMER, R. G. WOLFE and C. A. TOBIAS: The relation of radioresistance to budding in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. of Biochem. a. Biophysics* **49**, 110—122 (1954). — BECKHORN, E. J.: Photoreversal of the lengthening effect of uv-radiations on the bacterial lag period. *J. Bacter.* **63**, 687—688 (1952).

CALDAS, L. R., and T. CONSTANTIN: Courbes de survie de levures haploïdes et diploïdes soumises aux rayons ultraviolets. C. r. Soc. Biol. (Paris) **232**, 2356—2358 (1951). — CATCHESIDE, D. G.: Genetics of micro-organisms. London 1951. — CHRISTENSEN, J. J., and J. M. DALY: Adaptation in fungi. Ann. Rev. Microbiol. **5**, 57—70 (1951). — CLAUS, D.: Über Hemmstoffwirkung und Resistenzbildung bei Bakterien. Arch. Mikrobiol. **25**, 10—38 (1956).

DEAN, A. C. R., and C. N. HINSHELWOOD: Observations on bacterial adaptation. Adaptation in micro-organisms, S. 21—45. Cambridge 1953. — DE LONG, R., and C. C. LINDEGREN: Ultraviolet resistance as a criterion for determining the degree of ploidy in yeasts. Bacteriol. Proc. P. **63** (1951).

EAGLE, H., R. FLEISCHMANN and M. LEVY: Development of increased bacterial resistance to antibiotics. J. Bacter. **63**, 623—638 (1952). — ELLISON, S. A., B. F. ERLANGER and P. ALLEN: The chemical reversal of ultraviolet effects on bacteria. J. Bacter. **69**, 536—540 (1950). — ENGELHARD, H., u. T. HOUTERMANS: Über die Einwirkung von α -Strahlen und UV-Licht auf *Bacterium coli*. Z. Naturforsch. **5b**, 264—269 (1950). — ERRERA, M.: Mechanisms of biological action of ultraviolet and visible radiations. Progr. Biophysics and biophysical Chem. **3**, 88—130 (1953).

GADEN, E. L., and E. I. HENLEY: Induced resistance to gamma-irradiation in *Escherichia coli*. J. Bacter. **65**, 727—732 (1953). — GIBSON, M. J., and F. GIBSON: Development of resistance to dihydrostreptomycin by *Bacterium coli*. Nature (Lond.) **167**, 113—114 (1951). — GIESE, C. A., and W. H. SWANSON: Studies on the respiration of yeast after irradiation with ultraviolet light. J. Cellul. a. Comp. Physiol. **30**, 285—301 (1947). — GUNTER, E.: Factors determining the viability of selected micro-organisms in inorganic media. J. Bacter. **67**, 628—634 (1954).

HELMKE, R.: Über die Wirkung gleichzeitiger Bestrahlung mit inaktivierendem (2537A) und reaktivierendem (3650A) Ultraviolett und Licht (4538A) auf *Bact. coli* B. Strahlenther. **94**, 430—433 (1954). — HINSHELWOOD, C. N.: The chemical kinetics of the bacterial cell. Oxford 1946. — HOLLAENDER, A.: Symposium on radiobiology. S. 285—295. New York 1952. — HUBER, W.: Persönliche Mitteilung an GADEN (dort zitiert) 1952.

INGRAM, M.: An introduction to the biology of yeasts. London 1955.

JANKE, A.: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. Dresden-Leipzig 1946.

KILKENNY, B. C., and C. N. HINSHELWOOD: An investigation of some adaptive changes in yeast cells. Proc. Roy. Soc. (Lond.) **138**, 375 (1951); **139**, 575—583 (1951).

LANGENDORFF, H.: Zum Problem der indirekten Strahlenwirkung im biologischen Geschehen. Strahlenther. **83**, 33—40 (1950). — LATERJET, R.: Some factors influencing cell radiosensitivity by acting at the level of the primary biochemical action. Symposium on radiobiology 241—258. New York 1952.

MANDELSTAM, I., and I. YUDKIN: Studies in biochemical adaption. Biochemic. J. **51**, 686—693 (1952). — MAZIA, D., and H. I. HIRSHFIELD: The nucleus-dependence of P^{32} uptake by the cell. Science (Lancaster, Pa.) **112**, 297—298 (1950). — MEYER-SEITZ: Ultraviolette Strahlen. Berlin 1949.

OSTER, R. H.: Results of irradiating *Saccharomyces* with monochromatic ultraviolet light. J. Gen. Physiol. **18**, 243—250 (1934).

RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie. Berlin 1955. — ROEPKE, R. R., and F. E. MERCER: Lethal and sublethal effects of x-rays on *Escherichia coli*. J. Bacter. **54**, 731—743 (1947). — RUBIN, B. A.: Growth and mutation of bacteria during continuous irradiation. J. Bacter. **67**, 361—368 (1954).

SARACHEK, A.: A comparative study of the retardation of budding and cellular inactivation by ultraviolet radiation in polyploid *Saccharomyces* with special reference to photoreactivation. Cytologia **19**, 77—85 (1954). — SARACHEK, A., and

H. W. LUCKE: UV-inactivation of polyploid *Saccharomyces*. Arch. of Biochem. a. Biophysics **44**, 271—279 (1952). — SCHREIBER, H.: Strahlenbiologische Untersuchungen im UV-Bereich an *Saccharomyces turbidans* Hansen. Strahlenther. **49**, 541—595 (1934). — SIMONIS, W.: Physikalisch-chemische Grundlagen der Lebensprozesse (Strahlenbiologie). Fortschr. Bot. **14**, 229—256 (1953); **15**, 172—211 (1954); **17**, 413—482 (1955). — STANIER, R. Y.: Adaptation, evolutionary and physiological. Adaptation in microorganisms, S. 1—20. Cambridge 1953. — STEIN W., u. W. HARM: Modellvorstellungen zur UV-Inaktivierung von Coli-Bakterien im Lichte von Reaktivierungseffekten. Z. Naturforsch. **8b**, 742—754 (1953). — STEIN, W., u. W. HARM: Unterschiede im Inaktivierungsmechanismus von *Escherichia coli* mit Hilfe der Wärmereaktivierbarkeit und anderen Kriterien. Z. Naturforsch. **10b**, 519—534 (1955). — STRUGGER, S.: Untersuchungen über die vitale Fluorochromierung der Hefezelle. Flora (Jena) **137**, 73—94 (1944).

TOWNSEND, G. F., and A. SARACHEK: Characteristic alterations of the budding process of *Saccharomyces* induced by ultraviolet treatment. J. Bacter. **65**, 747—749 (1953).

WILD, D. G., and C. N. HINSHELWOOD: The behaviour in presence of phenol or thymol of a strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Roy. Soc. (Lond.) **142**, 427—436 (1954). — WILD, D. G., and C. N. HINSHELWOOD: The development of drug resistance in strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Resistance to 2,4-dinitrophenol and brilliant green. Proc. Roy. Soc. (Lond.) **144**, 287—297 (1955). — WITKIN, E. M.: Inherited differences in sensitivity to radiation in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **32**, 59—68 (1946). — WYSS, O., F. HAAS and W. S. STONE: Some effects of ultraviolet irradiation on micro-organisms. Radiation enetics, 133—140. Philadelphia 1950.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Jena,
der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin)

Die granulären Einschlüsse der Mycobakterien

Von

GERHART DREWS

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 19. September 1957)

Seit den klassischen Arbeiten von ROB. KOCH (1882) über den Erreger der Tuberkulose haben zahlreiche Autoren Untersuchungen über die granulären Einschlüsse der Mycobakterien veröffentlicht. Die Vielfalt der von ihnen geäußerten Auffassungen über die Natur der Bakteriengranula kommt in einer Zusammenstellung von SHINOHARA (1955) zum Ausdruck. Nach den neuesten Arbeiten gelten heute in der Bakteriologie als Granula lichtbrechende, im Phasenkontrast dunkel erscheinende und sich gegen die Umgebung scharf abgrenzende, kugelige bis ellipsoide, stark elektronenstreuende Körnchen (KRÜGER-THIEMER 1954, MUDD 1954, WINKLER 1953). Durchmesser und Zahl der Granula je Zelle sind sehr großen Schwankungen unterworfen (MUDD 1956, SHINOHARA 1955). Es wird allgemein die Auffassung vertreten, daß am Aufbau dieser Granula Phosphate, wahrscheinlich kondensierte Phosphate¹, beteiligt sind (DUGUID u. Mitarb. 1954, EBEL 1952, GLAUERT u. BRIEGER 1955, GRULA u. HARTSELL 1954, KRÜGER-THIEMER 1954, MEISSNER u. DILLER 1953, MUDD u. Mitarb. 1956, SALL u. Mitarb. 1955, WINDER u. DENNENY 1954 u. 1956, WINKLER 1953).

Der Nachweis dieser kondensierten Phosphate (Terminologie siehe THILO 1951) wurde entweder durch nur bedingt spezifische Methoden (metachromatische Färbung, Verhalten im Elektronenmikroskop) oder indirekt (Zunahme des säurelöslichen und des Gesamt-P² bei Granulahäufung) geführt. Dagegen konnten in verschiedenen Hefen hoch- und niederpolymere Polyphosphate — also kettenförmige Verbindungen — papierchromatographisch durch EBEL (1952) sowie LOHMANN u. LANGEN (1956) und entsprechende spezifische Phosphatasen durch KORNBERG (1956), HOFFMANN-OSTENHOF u. Mitarb. (1954/55) und MATTENHEIMER (1956) nachgewiesen werden. THILO u. Mitarb. (1956) fanden in *Acetabularia* hochpolymeres Phosphat.

Es soll daher nachstehend versucht werden, auch in Mycobakterien die extrahierten Phosphate zu identifizieren.

¹ Vielfach noch als Metaphosphate bezeichnet.

² Im Text verwendete Abkürzungen: P = Phosphor; RNS = Ribonucleinsäure; DNS = Desoxyribonucleinsäure; TES = Trichloressigsäure; DNP = Dinitrophenol; Sn = Sauton.

Cytologische und biochemische Untersuchungen haben in den letzten 10 Jahren zu der Erkenntnis geführt, daß zahlreiche Fermente, besonders die der Atmungskette, auch in der Bakterienzelle in bestimmten Fermentzentren lokalisiert sind. Nach Auffassung verschiedener Autoren sind nun diese „Reduktionsorte“ oder Mitochondrienäquivalente, wie sie auch

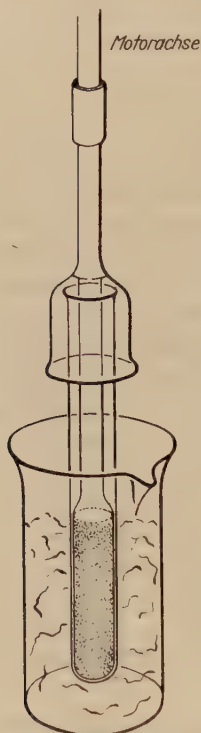


Abb. 1. Homogenisator modif. nach POTTER. Das Zerreiben der Bakterien erfolgt unter Eiskühlung

genannt werden, mit den oben genannten Granula identisch; d. h. die sich bildenden kondensierten Phosphate lagern sich in den Fermentzentren ab (DREWS 1955, KÖLBEL 1954/55, MUDD u. Mitarb. 1951, 1954). GLAUERT u. BRIEGER (1955) sowie SMITH u. Mitarb. (1954) lehnen auf Grund ihrer Beobachtungen eine morphologische Identität beider Strukturen ab. Da die Kleinheit der Objekte cytologische Untersuchungen sehr erschwert und die angewandten Methoden zum Teil nur bedingt spezifisch sind, soll diese Frage mit einer anderen Methodik untersucht werden. Die laufenden stoffwechselphysiologischen Untersuchungen an Mycobakterien boten Gelegenheit, an zellfreien Bakterien-Homogenisaten physiologische und morphologische Daten miteinander zu vergleichen.

Methodik¹

Die Trennung der extrahierten Phosphate erfolgte papierchromatographisch nach der Methode von GRUNZE u. THILO (1955). Als Papier diente Schl. u. Sch. 2043 b Mg, das vor Gebrauch mit 2n HCl gewaschen wurde. Das Papier wurde zungenförmig zugeschnitten und der Extrakt auf den schmalen Teil der Zunge (Breite 5 mm) aufgetragen. Die Methodik der Extraktion wird im Text beschrieben. Die Phosphate wurden in der Regel mit dem sauren Lösungsmittel Nr. 2 nach GRUNZE u. THILO, vereinzelt auch mit dem ammoniakalischen Lösungsmittel nach EBEL u. VOLMAR (Nr. 3 bei GRUNZE u. THILO) getrennt und nach dem Trocknen des Chromatogramms mit Ammoniummolybdat (HANES u. ISHERWOOD 1949) im UV-Licht entwickelt. Die Laufzeit des Chromatogramms betrug 16 Std bei 18°C.

Die Untersuchungen wurden vorwiegend an *Mycobacterium phlei* durchgeführt. Daneben wurden *Mycobacterium tuberculosis*, var. *bov.* (BCG), *Mycobacterium smegmatis* und *Mycobacterium lacticola* verwendet. Die Anzucht der Keime erfolgte im Submersverfahren auf dem Schütteltisch in Sauton-Nährlösung oder auf Agar. Der BCG-Stamm wuchs am besten als Deckenkultur in Fernbach-Kolben auf Sn-Medium. Für bestimmte Zwecke diente ein modifizierter Sn-Nährboden (S VI), der

¹ Frl. HEINZE und Frl. WEIDERMANN danke ich für die sorgfältige Durchführung der physiologischen Arbeiten und Frau BÖCKEL für die gewissenhafte Ausführung der Analysen.

gegenüber dem Sn (normal) 0,04% Asparagin, 2% Glycerin und 0,5% Phosphat enthielt. Die übrigen Zutaten waren die gleichen wie im Sn.

Zur Herstellung der zellfreien Extrakte wurden die Bakterien abzentrifugiert, 2mal mit Aqua dest. gewaschen und dann mit Aluminiumoxyd unter Kühlung (+ 2—3°) zerrieben, bei Fermentversuchen unter Zusatz von Puffer und 0,3% KCl. Das Zerreiben geschah entweder mit dem Handmörser oder einem Homogenisator, variiert nach POTTER (Abb. 1). Zum Vergleich wurden die Bakterien auch mit Ultra-Schall homogenisiert. Ein Zusatz von Glasperlen (\varnothing 0,2 mm) erhöht die zerstörende Wirkung des U.S.¹. Nach dem Zerreiben wurde die Suspension durch Zentrifugieren unter Kühlung von ganzen Bakterien, Zelltrümmern und Al_2O_3 befreit (3° C, 2mal je 10 bzw. 20 min bei 4200 · g, 1mal 30 min bei 15000 · g). Dieser zellfreie Extrakt wurde für Fermentuntersuchungen in der Regel noch gegen Puffer dialysiert und häufig durch Ultrazentrifugation noch weiter aufgetrennt.

Die Atnungsmessungen wurden mit der Warburg-Apparatur durchgeführt. Im Zentralgefäß befand sich 0,2 ml 15%ige KOH (zur Vergrößerung der Oberfläche wurde ein kleiner Papierfächer eingesetzt), im Hauptgefäß 1 ml Bakterienextrakt und im seitlichen Ansatz 1 ml Puffer (Veronal-Acetat-Puffer 0,005 mol, pH 7,0 oder Phosphat-Puffer gleicher Molarität mit Substrat (0,1 mol), KCl 0,2% und $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,02%).

Von jedem Bakterienextrakt wurde eine Probe im Elektronenmikroskop untersucht. Das Material kam unfixiert oder mit OsO_4 -Dämpfen fixiert zur Beobachtung.

Für analytische oder chromatographische Untersuchungen diente zumeist getrocknetes Bakterienmaterial. Zu diesem Zweck wurden die gewaschenen Bakterien rasch in tiefgekühltes Aceton (—60° C) eingerührt und die Suspension nach etwa 30 min auf der Fritte trockengesaugt. Das Material wurde im Exsiccator unter Vakuum in Gegenwart von Paraffin und CaCl_2 sicc. nachgetrocknet und dann unter Vakuum bei —6° C aufbewahrt. Für quantitative und analytische Untersuchungen erwies sich eine Nachtrocknung im Trockenschrank als notwendig. Die Verwendung von Trockenmaterial hat den Vorteil, daß man den Zeitraum zwischen Ernten der Kultur und Aufarbeitung beliebig verlängern kann. Die Unterbrechung der Stoffwechselvorgänge erfolgt auf diesem Wege auch sehr rasch, während das Abstoppen durch Trocknen des nassen Bakterienmaterials bei +60° C, wie es vielfach in der Literatur angegeben wird, mir bedenklich erscheint. Der Verlust an Phosphorverbindungen während der Acetonbehandlung beträgt 0,02% des Gesamt-P und ist daher zu vernachlässigen.

Ergebnisse

Granulabildung

Einleitend ist eine morphologische Beschreibung der Granula gegeben worden. Sie soll dazu dienen, den Gegenstand unserer Untersuchungen gegenüber anderen cytologischen Differenzierungen der Bakterienzelle abzugrenzen. Sie besagt aber nicht, daß alle durch diese Definition erfaßten Gebilde in ihrer chemischen Zusammensetzung und Funktion einheitlich sein müssen. Jedes Granulum durchläuft, wie auch die Bakterienzelle, einen Entwicklungsprozeß, und es ist durchaus denkbar, daß während dieses Vorganges sich die Zusammensetzung ändert. Trotz dieser Einschränkung sollen die Granula zunächst als eine einheitliche Fraktion betrachtet werden.

¹ Hergestellt aus Glaspulver N 3 Schott u. Gen.

Zahl und Größe der Granula wechseln, wie schon angedeutet, im Laufe der Entwicklung stark. Nach Untersuchungen von SHINOHARA (1955) bilden sich die meisten Granula bei *Myc. tuberculosis* zur Zeit des stärksten Wachstums zwischen dem 5. und 9. Tag, nehmen dann wieder an Zahl ab, um zwischen dem 14. und 17. Tag der Bebrütung noch einmal schwach zuzunehmen. RUSKA u. Mitarb. (1952) konnten in Kulturen von *Myc. avium* in der 2. Hälfte der Wachstumsphase, zwischen dem 10. und 25. Tag, ein starkes Ansteigen der Granulazahl feststellen. Nach 30 Tagen nahmen Wachstum und Zahl der Granula stark ab. MUDD u. Mitarb. beobachteten einen Anstieg der Granulabildung zwischen 7 und 24 Std (*Myc. tamnopheos*). Neben diesen vom jeweiligen Stamm und Kulturmedium bedingten Unterschieden in der Granulierung, kann man auch unter konstanten Bedingungen zuweilen ein Ausbleiben oder einen atypischen Verlauf der Granulabildung beobachten. Es kommt hinzu, daß die Ergebnisse der einzelnen Autoren mit einer unterschiedlichen Methodik gewonnen wurden (Beobachtung gefärbter Präparate oder lebender Bakterien mit dem Phasenkontrast oder fixierter Bakterien im Elektronenmikroskop). Die angegebenen Zahlen sind daher nur als Beispiele für das „normale“ Verhalten unter den gegebenen Bedingungen zu werten. Es kommt hinzu, daß die submikroskopisch kleinen Granula bei der angewandten Untersuchungsmethode (Phasenkontrast, metachromatische Färbung) nicht miterfaßt wurden.

In Schrägagarkulturen (auf Sn) von *Myc. phlei* konnte ich innerhalb der ersten 24 Std kaum eine Granulabildung beobachten. Sie beginnt nach 24 Std. Nach 3—4 Tagen nimmt die Zahl der Granula wieder ab. Bei *Myc. lacticola* werden ebenfalls nach 24 Std die ersten Granula sichtbar, bilden sich aber schon nach 72 Std wieder zurück. *Myc. smegmatis* verhält sich ähnlich wie *Myc. lacticola*. Die Granulabildung ist aber schwächer. Das Ergebnis entspricht den Untersuchungen von RUSKA u. Mitarb.; die Granula werden etwa in der Mitte der Wachstumsphase sichtbar und verschwinden am Ende dieser Periode wieder (Tab. 1).

In Flüssigkeitskulturen verläuft die Granulabildung im Prinzip ähnlich wie auf Agar. Sie ist im allgemeinen noch schwächer. In Deckglasagarkulturen mit BCG-Keimen (Sn + Serum) entstehen die Granula meistens erst dann, wenn das Wachstum in den Mikrokolonien schon fast sistiert.

Die cytochemischen und elektronenmikroskopischen Befunde, die auf einen hohen Gehalt der Granula an kondensierten Phosphaten hindeuten, sind durch chemische Analysen ergänzt worden. So konnten MEISSNER u. LEMKE (1954/55) zeigen, daß der Gesamt-P bei *Myc. tuberculosis* nur bei gleichzeitiger Bildung von Granula über 1% ansteigt und die „Metaphosphat“-Fraktion nur in granulierten Bakterien nachzuweisen ist. Von der Voraussetzung ausgehend, daß die Granula in den verschiedenen Mikroorganismen kondensierte Phosphate enthalten, hat es in der

Literatur nicht an Versuchen gefehlt, die Bedingung der Granulabildung kennenzulernen. Es ist besonders von Hefezellen bekannt, daß sie nach Verarmung an Phosphaten und anderen Speicherstoffen parallel mit energieliefernden Prozessen große Mengen Orthophosphat aufnehmen und als kondensiertes Phosphat speichern (HOFFMANN-OSTENHOF 1955, WIAME 1947). SALL u. Mitarb. (1956) haben an *Corynebacterium diphteriae*, MUDD u. Mitarb. an *Myc. thamnophaeos*, DUGUID u. Mitarb. (1954) und

Tabelle 1. *Mycobacterium lacticola*

Granulabildung in Abhängigkeit von der Bebrütungsdauer und Art des Nährbodens. Angegeben sind die im Phasenkontrast-Mikroskop sichtbaren Granula. Die Zahlen geben Prozentanteile wieder. Der Gehalt an 2,4-DNP betrug $1 \cdot 10^{-4}$ mol

Alter der Kultur		10½ Std			24 Std			48 Std			72 Std		
Nährboden		SVI+			SVI+			SVI+			SVI+		
		Sn	SVI	DNP	Sn	SVI	DNP	Sn	SVI	DNP	Sn	SVI	DNP
Agar-kultur	Bakt. ohne Granula	100	~90	100	87	56	90	72	32	70	80	30	~90
	mit 1 Granulum . .	—	—	—	10	28	7	11	18	9	7	37	—
	mit 2 Granula . .	—	—	—	3	12	3	12	41	21	10	23	—
	mit 3 u. mehr Gr.	—	—	—	—	4	—	5	9	—	3	10	—
Flüssigkeitskultur	Bakt. ohne Granula				75	60		71	42		71	42	
	mit 1 Granulum . .				6	31		5	14		5	14	
	mit 2 Granula . .				19	9		19	29		19	29	
	mit 3 u. mehr. Gr. .				—			5	15		5	15	

SMITH u. Mitarb. (1954) an *Aerobacter aerogenes* gezeigt, daß in ruhenden Bakterien in Gegenwart bestimmter Substrate und reichlichem Phosphatangebot die metachromatischen Granula zunehmen. Die Granulabildung ist also an Phosphorylierungsvorgänge gebunden, die in Gegenwart verschiedener Substrate ablaufen. Die mit ihr verknüpfte Erhöhung des Gesamt-P ist auch von bestimmten Ionen abhängig. So ist der Gesamt-P-Gehalt einer Sn-Kultur (*Myc. phlei*), die kein Mg enthielt, gegenüber der vollen Nährlösung um $\frac{1}{4}$ verringert (0,379 mg P/100 mg Trockensubstanz ohne Mg, 1,289 mit Mg). Auch K^+ (SALL u. Mitarb. 1956, MUDD et al. 1956, SMITH u. Mitarb. 1957), Mn^{++} und Zn^{++} (GRULA u. HARTSELL 1954) vermögen eine Steigerung der Phosphatspeicherung und Granulabildung zu veranlassen.

In wachsenden Kulturen bilden sich die Granula, wie wir oben sahen, in bestimmten Phasen der Entwicklung; wahrscheinlich dann, wenn durch Verlangsamung der Eiweiß- und Nucleinsäuresynthese bei noch reichlichem P- und C-Angebot eine energiereiche P-Bindung und Akkumulation möglich ist. Es wurde versucht, durch Variierung des Glycerin-, Phosphat- und Asparaginangebotes einen optimalen Nährboden für die Granulabildung zu finden. Eine bloße Erhöhung des P-Angebotes führte

zu keiner Steigerung der Granulierung. Am günstigsten war die oben als S VI bezeichnete Modifikation, die durch einen stark verringerten N-Gehalt und ein erhöhtes P-Angebot charakterisiert ist. Die Granulabildung setzt in der S VI-Kultur rascher als auf Sn ein, führt zu größeren Granula und hält auch länger an (Tab. 1). Gibt man zur S VI-Kultur 2,4-DNP ($1 \cdot 10^{-4}$ mol), so unterdrückt DNP, das die oxydative Phosphorylierung entkoppelt (LOOMIS and LIPMAN 1948), die Granulabildung für etwa 48 Std vollständig. Auch danach bleibt sie wesentlich schwächer als in der Vergleichskultur ohne DNP (s. Tab. 1). Steigert man die DNP-Konzentration, so findet eine Beeinträchtigung des Wachstums und auf Sn sogar eine Erhöhung der Granulazahl statt. Spezifische Wirkung von DNP durch Entkopplung und „unspezifische“ infolge allgemeiner Wachstumshemmung wirken hier gegensinnig.

Im allgemeinen gehen Erhöhung des Gesamt-P-Gehaltes und Zunahme der Granulierung parallel. Es konnte aber häufiger, vor allem in ruhenden aber auch wachsenden Kulturen trotz beträchtlicher Zunahme des P-Gehaltes ein Ausbleiben der Granulierung oder eine atypische Ausbildung diffuser Dunkelzonen beobachtet werden. Auf der anderen Seite bedingt stärkere Granulierung nicht immer eine Zunahme des Gesamt-P, wie das folgende Beispiel zeigt: Sn — schwach granuliert — Gesamt-P 1,760 mg P/100 mg Trockensubstanz; S VI-Kultur — stark granuliert — Gesamt-P 1,475 mg P/100 mg Substanz (Agar, 37° C, *Myc. phlei*, 48 Std Bebrütung).

Isolierung der Polyphosphate

Außer den genannten Tatsachen sprechen für eine Beteiligung von Phosphor-Verbindungen am Aufbau der Granula die metachromatische Färbung mit Toluidinblau u. a. basischen Farbstoffen (DREWS 1955, MUDD et al. 1956), der starke Kontrast und die Verdampfbarkeit im Elektronenmikroskop (KÖNIG u. WINKLER 1948, NIKLOWITZ u. DREWS 1955, SHINOHARA 1955), die Löslichkeit in Säuren (WINKLER 1953) und das Überdauern der Granula nach Behandlung mit Desoxyribonuclease und Ribonuclease und Fettlösungsmitteln (GRULA u. HARTSELL 1954). Alle diese Untersuchungen brachten keine Klärung der chemischen Natur der Phosphorverbindungen. Erst EBEL (1952), LOHMANN u. LANGEN (1956) sowie THILO u. Mitarb. gelang der papierchromatographische Nachweis kettenförmiger kondensierter Phosphate in verschiedenen Mikroorganismen. Aus der Arbeit von WINDER u. DENNENY (1956) kann man entnehmen, daß bei verschiedenen Mycobakterien ein hoher Prozentsatz des Gesamt-P als säureunlösliches Phosphat vorliegt. Diese Fraktion erhält keine RNS oder DNS und besteht wahrscheinlich aus hochpolymerem Phosphat, das in irgendeiner Form mit Proteinen säureunlöslich gebunden ist (BELOZERSKI 1955, LOHMANN u. LANGEN 1956, HOFFMANN-OSTENHOF 1955).

Die möglichst schonende Isolierung der Polyphosphate aus unseren Stämmen bereitete daher auch relativ große Schwierigkeit. Als Ausgangsmaterial diente in den meisten Fällen eine acetonetrocknete, 2—3 tägige S VI-Kultur von *Myc. phlei*. Das Material wurde mit der Trichloressigsäure (TES) verrieben (3—5% ig, 4°C) und 5 Std zum Teil auch bis zu 48 Std in der Kälte oder bei Zimmertemperatur unter gelegentlichem Umrühren extrahiert. Die TES entfernt bekanntlich aus den Bakterien außer dem säurelöslichen Phosphat noch RNS und Polysaccharid-Protein-Lipoid-Komplexe (WESTPHAL u. LÜDERITZ 1954). Diese Verbindungen aus dem Extrakt zu entfernen, ohne gleichzeitig die Phosphate zu eliminieren, gelang nicht vollständig. Ließ man den Extrakt durch eine mit Glaspulver überschichtete G 3-Fritte laufen, so blieben zwar störende Begleitsubstanzen, aber auch die Phosphate zurück. Außer der TES-Extraktion wurde die Abtrennung der kondensierten Phosphate auch nach der von LOHMANN u. LANGEN (Extraktion mit gesättigter Perchloratlösung und Kochen der Bakterien im neutralen Medium) und der von SCHMIDT u. THANNHAUSER (1945) angegebenen Methode (alkalische Hydrolyse) versucht. Es wurde dabei wie folgt verfahren: 1 g Trockensubstanz wird mit 6 ml eiskalter TES (5% ig) im Mörtel verrieben und dann 5 Std unter gelegentlichem Umrühren im Kühlschrank (+ 3°C) aufbewahrt. Nach dem Abzentrifugieren (Kühlraum) und Nachwaschen mit 2 ml TES werden die Bakterien mit dem gleichen Volumen Aqua dest. verrührt und die Suspension mit Na_2CO_3 bzw. 1/10 n NaOH neutralisiert. Die neutralisierte Aufschwemmung wird 5—8 min gekocht, abgekühlt, zentrifugiert und die Phosphate bei pH 7,5 bzw. 2,5 mit Äthanol (1 : 1) im Überstehenden gefällt. Alkohol fällt außer Phosphaten auch noch Proteine und verschiedene Zucker. Enteiweißt man aber den Extrakt (TES), so werden bei der Fällung die Phosphate mitgerissen und gehen so verloren (Abb. 2, Bahn 3). Der Niederschlag wurde nach dem Auswaschen mit 50% igem Alkohol in ungefähr 0,2 ml n/10 HCl aufgenommen, vom ungelösten Rest abzentrifugiert und aufgetragen (0,09 ml).

Aus dem TES-Extrakt wurde die TES durch Ausäthern entfernt und nach Einstellung des pH -Wertes auf 7,5—8,0 mit Äthanol gefällt. Auch die von THILO u. Mitarb. (1956) angegebene Methode der Fällung mit Ba^{++} und anschließendem Umsetzen der schwerlöslichen Ba-Phosphate in die leichter lösliche Na-Form mit dem Kationen-Austauscher (KPS 200) gelang. Jedoch stören unter Umständen dabei hochmolekulare Verbindungen, die sich außer den Phosphaten noch im Extrakt befanden. Für die alkalische Hydrolyse verwendete ich frisch geerntete und gewaschene S VI-Kulturen. Das Material wurde mit 2 n NaOH versetzt und 3 Std bei + 3°C gehalten, dann bis zur Sättigung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt, abzentrifugiert, gegen Aqua dest. dialysiert und bei pH 7,5 mit Alkohol gefällt. Die Bakterien wurden nach der alkalischen Hydrolyse noch mit Wasser extrahiert (7 min, 100°C, pH 7,0).

Als günstigste Methode erwies sich die TES-Extraktion und das anschließende Aufkochen bei pH 7,0 trotz der durch Begleitsubstanzen verursachten, mehr oder weniger starken Verzögerungen im Lauf einzelner Bahnen.

Deutlich traten im Chromatogramm Orthophosphat und eine nicht wandernde Fraktion sowohl im TES-Extrakt wie auch im Kochsaft auf (Abb. 2, 3). Die in Höhe Pyrophosphat laufende Fraktion gab eine deutliche Reaktion mit Naphthoresorcin (s. LINSKENS, S. 64, g). Sie besteht wahrscheinlich aus Fructose-1,6-diphosphat und anderen P-Estern (LOHMANN u. LANGEN 1956 b). Pyrophosphat soll in den Zellen der Mikro-

organismen nicht vorkommen; sowohl im TES-Extrakt wie auch im Kochsaft findet aber eine gewisse hydrolytische Spaltung des Polyphosphats statt und deshalb wäre auch an ein Auftreten von Pyrophosphat im Chromatogramm zu denken. An Niederpolymeren konnten Tri-, Tetra- und Pentaphosphat durch Vergleich mit Testsubstanzen oder durch Ermittlung der R_f - und P_K -Werte (GRUNZE u. THILO 1955) nachgewiesen



Abb. 2

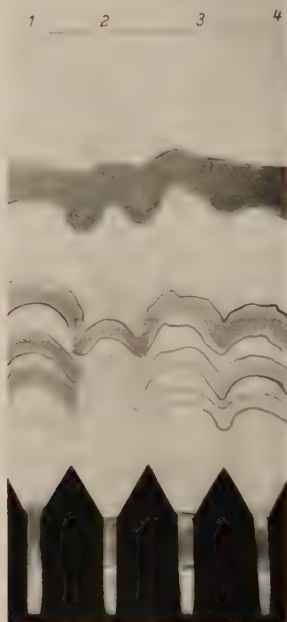


Abb. 3

Abb. 2. *Mycobacterium phlei*. Phosphatangereicherte Kultur. Bahn 2: TES-Extrakt; Bahn 3: Kochsaft nach Eiweißfällung; Bahn 4: Kochsaft, Phosphate mit Alkohol gefällt. Bahn 1: Testsubstanzen, von oben nach unten: Orthophosphat, Diphosphat, Triphosphat, Tetraphosphat, Trimetaphosphat, Grahamsches Salz

Abb. 3. *Mycobacterium phlei*. S VI-Kultur. Bahn 1: Testsubstanz; Bahn 2: TES-Extrakt; Bahn 3: Kochsaft; Bahn 4: Kochsaft hydrolysiert

werden. Ihre Konzentration war im Verhältnis zu den anderen Fraktionen auf dem Chromatogramm sehr gering. Bei der Hydrolyse der am Start verbleibenden Substanz (60 min, pH 2,0, 70°C oder 5 min 100°C) traten außer den genannten keine weiteren Fraktionen auf (Abb. 3, Bahn 4).

Im BCG-Stamm gelang der Nachweis der kondensierten Phosphate mit den oben genannten Methoden — auch nach vorhergehender 15stündiger Extraktion mit Äther-Alkohol (1:2) nicht.

LOHMANN u. LANGEN (1956a) berechnen den Polyphosphatgehalt nach der Formel: Polyphosphat-P = $\Delta_0^7 - \Delta_7^{30x}$, weil bei 7 minutiger

Hydrolyse auch RNS, Fructose-1,6-diphosphat und andere P-Ester zum Teil hydrolysieren. Der auf diese Weise bestimmte Polyphosphatgehalt verschiedener Mycobakterienkulturen war außerordentlich gering oder ergab sogar negative Werte, obwohl die Bakterien zahlreiche meta-chromatische Granula besaßen und die Polyphosphate sich papierchromatographisch nachweisen ließen.

Nach Untersuchungen, über die an anderer Stelle berichtet werden soll, hydrolysieren die Polyphosphate der untersuchten Bakterien nur langsam, keinesfalls aber vollständig in 7 min. Es muß offenbleiben, ob die Ursache eine sehr feste Bindung an organische Substanz oder ein besonders hoher Polymerisationsgrad ist. Metaphosphate konnten nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Eine im TES-Extrakt befindliche, über dem Orthophosphat wandernde Verbindung (mit schwach positiver Zuckerreaktion) verzögerte oft den Lauf der Lösungsmittelfront auf dieser Bahn (Abb. 2 u. 3).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Außer den genannten Granula gibt es auch bei Mycobakterien sogenannte Mitochondrienäquivalente (Syn. Reduktionsorte). Nach den cytochemischen Untersuchungen von MUDD u. Mitarb. (1956) können Phosphatablagerungen in den Mitochondrienäquivalenten auftreten. P-Granula und Reduktionsorte brauchen aber nicht identisch zu sein. Es sollte nun versucht werden, beide Granulaarten durch fraktionierte Zentrifugation voneinander zu trennen und näher zu charakterisieren.

Als Ausgangsmaterial dienten zellfreie Extrakte von *Myc. phlei*, deren Herstellung im methodischen Teil näher beschrieben worden ist. Der von ganzen Bakterien, Zelltrümmern und Al_2O_3 befreite Rohextrakt (R) ist eine klare, gelbliche opaleszierende Flüssigkeit. Er wurde in der gekühlten Ultrazentrifuge bei $180000 \cdot g$ 90 min zentrifugiert und das Überstehende vom gelblich-bräunlich, gelartigen Sediment abpipettiert. Das Sediment ließ sich nur schwer resuspendieren. Es wurde in Aqua dest. bzw. Puffer wieder aufgenommen.

Betrachtet man den Extrakt R im Elektronenmikroskop, so findet man neben zumeist strukturloser, kontrastarmer Plasmasubstanz kontrastreiche Partikel von unterschiedlicher Größe und Gestalt. In der plasmatischen Substanz liegen vereinzelt rundliche Gebilde mit einem Durchmesser von $300\text{--}400\text{ m}\mu$ (Abb. 4, „Pfeil“). Es ist denkbar, daß sie mit den Mitochondrienäquivalenten identisch sind, die beim Zerreiben der Zellen mit Al_2O_3 größtenteils zerstört werden. Unter den kontrastreichen Partikeln waren einmal Granula unterschiedlicher Größe (bis zu $500\text{ m}\mu$) zu sehen, die bei starkem Elektronenbeschuß ringförmige Strukturen hinterließen (Abb. 5), wie sie auch aus der Literatur bekannt sind (KÖNIG

¹ Δ_0 direkt bestimmbares anorganisches Phosphat; Δ_7 anorganisches Phosphat nach 7 und Δ_{30} nach 30 min langer Hydrolyse in $n/1\text{ HCl}$.

u. WINKLER 1948, SHINOHARA 1950, NIKLOWITZ u. DREWS 1955). Diese Gebilde sind die eigentlichen metachromatischen Phosphatgranula. Außer

Abb. 4—8
elektronenmikroskopische Aufnahmen
11000:1; nachvergrößert

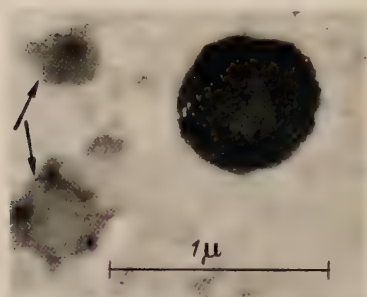


Abb. 4. *Mycobacterium phlei*. Zellfreier Extrakt.
Mitochondrienäquivalente?
Kontrastreiches Granulum

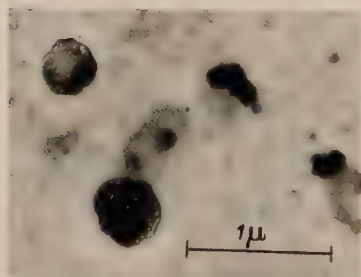


Abb. 6. *Mycobacterium phlei*. Zellfreier Extrakt.
Verschiedene kontrastreiche Granula
nach Elektronenbeschuß

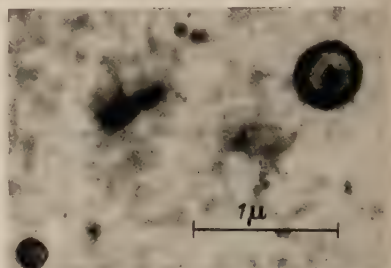


Abb. 5. *Mycobacterium phlei*. Zellfreier Extrakt
mit Phosphatgranula nach Elektronenbeschuß

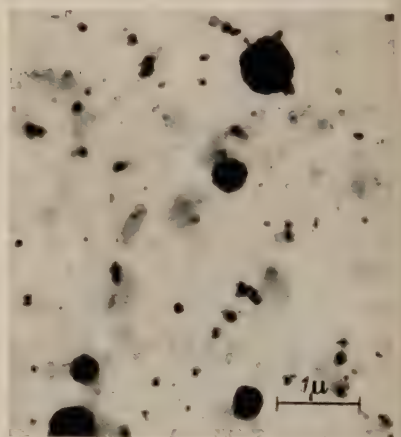


Abb. 7. *Mycobacterium phlei*. Zellfreier Extrakt
aus phosphatangereicherter Kultur

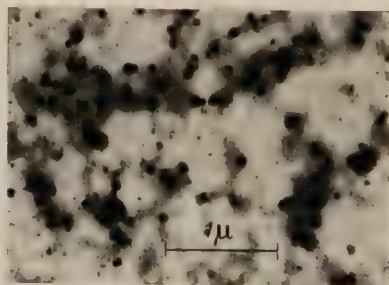


Abb. 8. *Mycobacterium phlei*. S VI-Kultur. Zellfreier Extrakt

diesen waren Gebilde vorhanden, die ebenfalls stark elektronenstreuend wirkten, einen Durchmesser bis zu 1μ erreichten und sehr rasch zu eigen-

tümlichen, wabigen Gebilden verdampften (Abb. 4 u. 6). Als dritter Bestandteil waren kugelige bis unregelmäßig geformte Partikel vorhanden, die häufig fest mit plasmatischen Resten in Verbindung standen und sich bei elektronenmikroskopischer Bestrahlung nicht veränderten (Abb. 7 u. 8).

Die kontrastreichen Granula, die keine oder ringförmige Verdampfungsformen bildeten, befanden sich nach Ultrazentrifugation (90 min, $180\,000 \cdot g$) zum größten Teil im Überstehenden. Die leicht verdampfenden, großen Granula waren zu meist ebenfalls im Überstehenden, vereinzelt auch im Sediment zu finden. Die übrigen kontrastreichen Partikel und die runden, plasmatischen Gebilde lagen im Sediment.

Dem prozentual hohen Anteil an Granula entspricht der P-Gehalt des Überstehenden. So enthält z. B. das Sediment auf 1 mg Gesamt-N 0,0173 mg P, das Überstehende 0,0889 mg P je 1 mg Gesamt-N.

Die Fermenttätigkeit zellfreier Extrakte

Aus der neueren Literatur ist bekannt, daß zellfreie Extrakte verschiedener Bakterien und die aus ihnen mit Hilfe der Ultrazentrifuge sedimentierbaren Partikel unter O_2 -Aufnahme verschiedene Substrate oxydieren können (ALEXANDER u. WILSON 1955, ASNIS u. Mitarb. 1956, BRUEMMER 1957, COUSINS 1956, MILLMANN u. DARTER 1956). Diesen Befunden entsprechen die vorliegenden Ergebnisse. Am weitaus stärksten wurde Lactat oxydiert, und zwar vorwiegend durch die bei $180\,000 \cdot g$ sedimentierbare Partikelfraktion (Abb. 9). Untersucht man Überstehendes und Sediment auf ihren Granulagehalt und vergleicht diesen mit der Intensität der O_2 -Aufnahme, so geht daraus hervor, daß die kontrastreichen Partikel nicht für die Fermenttätigkeit verantwortlich sein können. Denn auch das Sediment, in dem keine Granula enthalten sind, oxydiert Milchsäure. Eine Zunahme an Granula bringt keine Steigerung des O_2 -Verbrauches und das Überstehende, das im Durchschnitt mehr

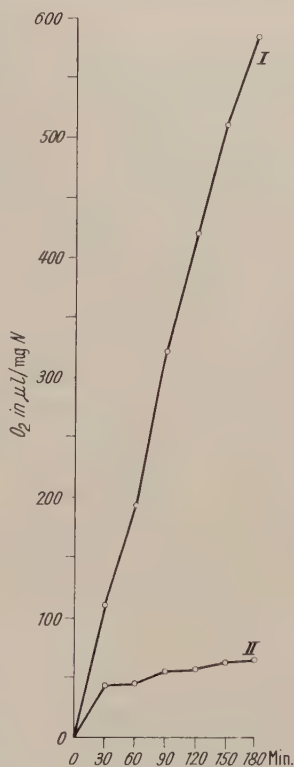


Abb. 9. *Mycobacterium phlei* (S VI-Kultur). O_2 -Aufnahme zellfreier Extrakte nach der Warburg-Methode.

Ansatz: 1 ml zellfreier Extrakt (I Sediment bei $180\,000 \cdot g$, II Überstehendes bei $180\,000 \cdot g$), 1 ml Veronal-Acetat-Puffer (0,005 Mol, pH 7,0) + 0,1 Mol K-Lactat, 0,04% $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,001% $CaCl_2 \cdot 6 H_2O$. Die Kurve gibt den O_2 -Verbrauch in μl bezogen auf 1 mg Zell-N. Die Werte für die Leeratmung sind abgezogen

Granula enthält als das Sediment, atmet schwächer als das Sediment. Versuche mit anderen Substraten (Bestandteile des Citronensäurecyclus, Kohlenhydrate) führten zu einem wesentlich geringeren O_2 -Verbrauch im Vergleich mit Lactat. Sie verliefen im Prinzip aber gleichsinnig.

Diskussion

Nach den vorliegenden und in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen schwankt der Gehalt der Mycobakterien an Granula beträchtlich, je nach Stamm, Nährboden und Bebrütungsdauer. Granula werden gebildet, wenn ein ausreichendes Phosphatangebot und eine geeignete Energiequelle für eine Phosphorylierung zur Verfügung stehen. Bestimmte Ionen (K^+ , Mg^{++} , Mn^{++}) fördern diesen Vorgang. In wachsenden Kulturen setzt die Granulabildung meist dann ein, wenn der Nährboden noch nicht vollständig erschöpft ist, also P und C noch ausreichend zur Verfügung stehen, das Wachstum aber allmählich nachläßt, im allgemeinen etwa in der 2. Hälfte oder am Ende der Wachstumsphase. In der Regel ist mit dem Auftreten der Granula auch eine Zunahme des Gesamt-P verbunden. Eine Granulabildung kann aber auch ohne Veränderung der Gesamt-P-Menge erfolgen. Es wäre denkbar, daß dieser Vorgang so abläuft, daß in der Zelle schon vorhandenes Polyphosphat sich entmischt und in Form von Granula gespeichert wird. Mehr Wahrscheinlichkeit besitzt ein anderer Weg. In bestimmten Stoffwechselphasen halten sich Phosphorylierung und Dephosphorylierung das Gleichgewicht. Der Gesamt-P-Gehalt bleibt gleich, es tritt nur eine Verschiebung innerhalb der P-Fractionen ein. Während dieser Umphosphorylierung kann neues Polyphosphat eventuell durch Anlagerung an RNS gebildet werden. Nach Untersuchungen von LOHMANN u. LANGEN (1956) wird in P-verarmten Hefekulturen zunächst hochpolymeres und erst später niederpolymeres Phosphat gebildet. KORNBERG u. Mitarb. (1956) konnten mit Hilfe zellfreier Extrakte von *E. coli* eine Polyphosphatsynthese durchführen: $x \text{ ATP} + [(PO_3^-)_n] \rightarrow x \text{ ADP} + [(PO_3^-)_{n+x}]$. Es wäre denkbar, daß bei den Mycobakterien durch Dephosphorylierung freiwerdendes Ortho-Phosphat über ATP in der Poly-P-Fraktion angereichert wird.

Wie die Warburg-Versuche zeigen, sind P-Granula und Reduktionsorte nicht identisch. Das schließt aber nicht aus, daß in den in relativ konstanter Zahl (MUDD u. Mitarb. 1956) auftretenden Mitochondrienäquivalenten Poly-P gespeichert wird. So konnte NIKLOWITZ (mündl. Mitt.) in Mitochondrien von Schleimpilzen Polyphosphatansammlungen beobachten. Außer reinen Poly-P-Granula gibt es also wahrscheinlich Reduktionsorte mit eingelagertem Polyphosphat. Das oben beschriebene Verhalten der Granula im Elektronenmikroskop deutet auch auf eine unterschiedliche Zusammensetzung der Granula hin. Besonders interessant ist das Auftreten von Inhomogenitäten in einzelnen Granula (Abb. 6). Es

ist sehr wahrscheinlich, daß die Granula nicht nur kondensierte Phosphate sondern auch Phosphatide, RNS (DREWS 1955, LEMBKE u. MENNINGER 1952) und andere Verbindungen in unterschiedlicher Verteilung enthalten, je nach dem physiologischen Zustand der einzelnen Zellen bzw. Granula.

Zusammenfassung

In wachsenden Kulturen (Agar und flüssiges Medium, 37° C) von *Mycobacterium phlei*, *Myc. lacticola* und *Myc. smegmatis* sind die meisten Phosphatgranula nach etwa 48 Std Bebrütung, also in der 2. Hälfte der Wachstumsphase, lichtmikroskopisch zu beobachten.

Die Stärke der Granulierung ist vom Verhältnis Stickstoff, Kohlenstoff und Phosphor im Medium und der Gegenwart von Kalium- und Magnesium-Ionen abhängig. In ruhenden und wachsenden Kulturen von *Myc. phlei* gehen häufig, keineswegs aber regelmäßig Granulierung und Zunahme des Gesamt-P parallel.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an zellfreien Extrakten von *Myc. phlei* und *Myc. lacticola* deuten auf eine unterschiedliche Zusammensetzung der verschiedenen Granula hin.

Im Trichloressigsäureextrakt und Kochsaft von *Myc. phlei* und *Myc. lacticola* ließen sich Polyphosphate papierchromatographisch nachweisen.

Der Sauerstoffverbrauch durch zellfreie Extrakte von *Myc. phlei* in Gegenwart bestimmter Substrate ist in der bei 180000 · g sedimentierbaren Fraktion wesentlich stärker als im Überstehenden.

Die Phosphatgranula sind nicht mit diesen fermenthaltigen, sedimentierbaren Partikeln identisch.

Die Bildung und das Verhältnis der verschiedenen Granulatypen zueinander wird diskutiert.

Literatur

ALEXANDER, M., and P. W. WILSON: Enzyme localization in *Azotobacter vinelandii*. Proc. Nat. Acad. Sci. **41**, 843 (1955). — ASNIS, R. E., V. G. VELY and M. C. GLICK: Some enzymatic activities of a particulate fraction from sonic lysates of *E. coli*. J. Bacter. **72**, 314 (1956).

BELOZERSKII, A. N.: The metaphosphonucleic complexes of yeast and the chemical nature of volutin. Congr. intern. biochim. 1955, 78. Ref.: Chem. Abstr. **50**, 14026 (1956). — BRUEMMER, J. H.: Electron transporting particle from *Azotobacter vinelandii*. J. Bacter. **73**, 113 (1957).

COUSINS, F. B.: The lactic acid oxidase of the mycobacteria. Biochemic. J. **64**, 297 (1956).

DREWS, G.: Zur Kenntnis der Cytologie von *Rhodospirillum rubrum*. Arch. Mikrobiol. **23**, 1 (1955). — DUGUID, J. P., I. W. SMITH and J. F. WILKINSON: Volutin production in *Bact. aerogenes*. J. of Path. **67**, 289 (1954).

EBEL, J. P.: Recherches sur les Polyphosphates. Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **34**, 321, 330 u. 491 (1952).

GLAUERT, A. M., and E. M. BRIEGER: The electrone-dense bodies of *Mycobacterium phlei*. J. Gen. Microbiol. **13**, 310 (1955). — GRULA, E. A., and S. E. HARTSELL: Intracellular structures in *Caulobacter vibrioides*. J. Bacter. **68**, 498 (1954). —

GRUNZE, H., u. E. THILO: Die Papierchromatographie der kond. Phosphate. Sitzgsber. d. Dtsch. Akad. d. Wiss. zu Berlin. 2. Aufl. Berlin 1955.

HANES, C. S., and F. A. ISHERWOOD: Nature (Lond.) **164**, 1107 (1949). — HOFFMANN-OSTENHOF, O., A. KLIMA, J. KENEDY u. K. KECK: Zur Kenntnis des Phosphatstoffwechsels der Hefe. Monatsh. Chem. (Wien) **86**, 604 (1955).

KOCH, R.: Berl. klin. Wschr. **1882**, 15. — KÖLBEL, H.: Untersuchungen an Myc. tubercul. Z. Naturforsch. **10b**, 433 (1955). — KÖNIG, H., u. A. WINKLER: Über Einschlüsse von Bakterien und ihre Veränderungen im Elektronenmikroskop. Naturwissenschaften **35**, 136 (1948). — KORNBERG, A., S. R. KORNBERG and E. SIMMS: Metaphosphate synthase by an enzyme from E. coli. Biochim. et Biophysica Acta **20**, 215 (1956). — KRÜGER-THIEMER, E.: Zur Definition der Mycobakteriengranula. Naturwissenschaften **41**, 146 (1954).

LEMBKE, A., u. H. MENNINGER: Stoffwechseluntersuchungen an Myc. tubercul. Kieler Milchwirtsch. Forschber. **4**, 41—84 (1952). — LOHMANN, K., u. P. LANGEN: Über die kond. Phosphate in Organismen. Dtsch. Akad. d. Wiss. zu Berlin 1956, S. 297. — Untersuchungen an den kond. Phosphaten der Hefe. Biochem. Z. **328**, 1 (1956a). — LOOMIS, W. F., and F. LIPMAN: J. of Biol. Chem. **173**, 807 (1948).

MATTENHEIMER, H.: Metaphosphatasen der Bierhefen. Naturwissenschaften **40**, 530 (1953). — Die Substratspezifität anorgan. Poly- und Metaphosphatasen. Hoppe-Seylers Z. **303**, 107 (1956). — MEISSNER, J., u. W. DILLER: Über die Aufnahme von Ortho- und Metaphosphat durch das Mycobact. tuberc. Z. Hyg. **137**, 518 (1953). — MEISSNER, J., u. J. LEMKE: Über die Aufnahme ³²P-markierter kondensierter Phosphate bei Myc. tuberc. 3. Jahresber. Tubercul Forsch. Inst. Borstel 1954/55. — MILLMAN, I., and R. W. DARTER: Intracellular localization of enzymes in Myc. tuberculosis. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **91**, 271 (1956). — MUDD, S., L. C. WINTERSCHIED, E. D. DE LAMATER and H. J. HENDERSON: Evidence suggesting that the granules of mycobacteria are mitochondria. J. Bacter. **62**, 459 (1951). — MUDD, St., K. TAKEYA and H. J. HENDERSON: Electron scattering granules and reducing sites in Mycobacteria. J. Bacter. **72**, 767 (1956).

NIKLOWITZ, W., u. G. DREWS: Zur elektronenmikroskopischen Darstellung der Feinstruktur von Rhodospirillum rubrum. Arch. Mikrobiol. **23**, 123 (1955).

RUSKA, H., G. BRINGMANN, I. NECKEL u. G. SCHUSTER: Über die Entwicklung sowie den morphologischen und cytochemischen Aufbau von Myc. avium. Z. wiss. Mikrosk. **60**, 425 (1952).

SALL, T., S. MUDD and J. DAVIES: Factors conditioning the accumulation and disappearance of metaphosphate. Arch. of Biochem. a. Biophysics **60**, 130 (1956). — SHINOHARA, Ch.: An electron microscopic study of tubercle bacilli. I—III. Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ. **6**, 1 (1955). — SMITH, I., J. F. WILKINSON and J. P. DUGUID: Volutin production in Aerobacter aerogenes. J. Bacter. **68**, 450 (1954).

THILO, E.: Aus der Chemie der kondensierten Phosphate. Angew. Chem. **63**, 508 (1951). — THILO, E., H. GRUNZE, J. HÄMMERLING u. G. WERZ: Über Isolierung und Identifizierung der Polyphosphate aus Acetabularia med. Z. Naturforsch. **11b**, 266 (1956).

WESTPHAL, O., u. O. LÜDERITZ: Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegat. Bakt. Angew. Chem. **66**, 407 (1954). — WIAME, J. M.: The occurrence and physiological behavior of two metaphosphate fractions in yeast. J. of Biol. Chem. **178**, 919 (1949). — WINDER, F., and J. M. DENNENY: Metaphosphate in mycobact. metabolism. Nature (Lond.) **174**, 353 (1954). — Phosphorus metabolism of mycobacteria. J. Gen. Microbiol. **15**, 1 (1956). — WINKLER, A.: The metachromatic granula of bacteria. Symp. Bact. Cytol., Rom (1953).

(Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt
und dem Botanischen Institut der Universität Mainz)

Untersuchungen zur mikrobiellen Benzoloxydation

I. Nachweis und Chemismus des Benzolabbaus

Von

TH. WIELAND, G. GRISS und B. HACCUS

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. September 1957)

Der mikrobielle Abbau aromatischer Verbindungen im Boden wurde zuerst durch STÖRMER (1908) nachgewiesen. Da Benzolderivate durch Industrieabwässer und neuerdings auch durch die Verwendung gewisser Insekticide in die Erde kommen, gewinnen diese Vorgänge zunehmend an Interesse. Über den Abbau aromatischer Substanzen, speziell von Phenolen, existiert eine umfangreiche Literatur. Es wurden, wie aus der zusammenfassenden Übersicht von ZOBELL (1950) hervorgeht, verschiedene Bakterien, Hefen und Pilze isoliert, die fähig sind, Benzolderivate als einzige Kohlenstoffquelle zu verwerten. Unsubstituiertes Benzol ist jedoch, wie die meisten Autoren übereinstimmend berichten, für Mikroorganismen sehr viel schwerer angreifbar als die mit einer oder mehreren Seitenketten ausgestatteten Derivate (vgl. MATTHEWS 1924, TAUSZ u. DONATH 1930, EVANS 1947, CZEKALOWSKI u. SKARZYNSKI 1948 sowie STANIER 1948).

WAGNER (1914) berichtet über zwei als „*Bacterium benzoli* a und b“ bezeichnete Organismen, die auf einer mit Benzol gesättigten Mineralsalzlösung zu wachsen vermochten. Unter den 23 *Mycobacterium*-Stämmen, die VIERLING (1920) aus Erde isoliert hat, befanden sich ebenfalls einige Benzolersetzer. Später hat TAUSSON (1929) mit verbesserten Methoden Reinkulturen gezüchtet, die Toluol als einzige Kohlenstoffquelle verwerten konnten, dabei erwies sich ein als „*Bacterium toluolicum* c“ bezeichneter Stamm zugleich auch als Benzoloxydant. GRANT u. ZOBELL (1944) haben benzolabbauende Mikroben aus marinen Sedimenten isoliert.

Die erste mit modernen chemischen Methoden durchgeführte Untersuchung des mikrobiellen Benzolabbaus stammt von KLEINZELLER u. FENCL (1953). Die Verf. haben mit einem Organismus gearbeitet, dem sie eine nähere Verwandtschaft mit *Micrococcus sphaeroides* zuschreiben. Bei dieser Species handelt es sich um eine von GRAY u. THORNTON (1928) in einer Untersuchung über aromatische Verbindungen abbauende Bakterien neu beschriebene Form, deren systematische Stellung zweifelhaft ist (vgl. BERGEYS Manual, 6. Aufl. 1948, S. 275). Auf die Ergebnisse der beiden Verf. über den Chemismus der Benzoloxydation werden wir im folgenden noch näher eingehen.

Da in keiner der genannten Untersuchungen ein für systematische Zwecke ausreichend beschriebener Organismus verwendet worden ist

und es sich auch dann, wenn Namen genannt werden, meist um Arten von zweifelhafter systematischer Stellung handelt, erschien es uns nicht überflüssig, das Problem der mikrobiellen Benzoloxydation erneut anzugreifen. Der erste Teil unserer Untersuchungen wird sich, nach einer kurzen Besprechung der Isolierungs- und Züchtungsmethoden von Benzoloxydanten, vor allem mit dem Chemismus des mikrobiellen Benzolabbaus beschäftigen. In einer nachfolgenden Mitteilung (HACCUS u. HELFRICH) soll die systematische Stellung der verwendeten Organismen erörtert werden.

I. Züchtungsmethoden

Bei der Herstellung geeigneter Züchtungsbedingungen für benzolabbauende Mikroorganismen ist zu bedenken, daß es sich beim Benzol um einen leicht flüchtigen, in wäßriger Salzlösung sehr schwer löslichen¹ und spezifisch leichteren Stoff handelt. Man muß daher durch eine besondere Anordnung dafür sorgen, daß die Oberfläche der Nährlösung nicht mit einer Benzolschicht bedeckt ist, denn die bakterielle Benzolverwertung bedarf aerober Bedingungen. Am besten geht man

von einer benzolgesättigten Nährlösung aus und sorgt für kontinuierlichen Nachschub des verbrauchten Benzols.

TAUSSON (1929) hat zwei Verfahren beschrieben. Bei dem einen wird die Benzolsättigung der Mineralsalzlösung dadurch aufrecht erhalten, daß das (mit einer gebogenen Pipette unter eine in der Lösung befindliche umgekehrte Petri-Schale gebrachte und dadurch am Aufsteigen gehinderte) Benzol dauernd mit der Lösung in Verbindung steht (= „Methode des Diffusionszuflusses“). Bei dem zweiten wird ein offenes Gefäß mit Nährlösung in einen mit Benzolwasser beschickten Exsiccator gestellt.

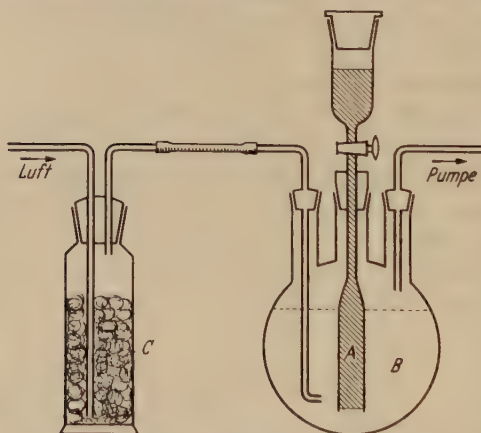


Abb. 1. Apparatur zur Züchtung größerer Mengen benzolabbauender Mikroorganismen.
A Benzol; B Mineralsalzlösung; C Watte

Wir haben beide Verfahren ausprobiert, wobei sich die erste Methode als brauchbarer erwies. Zur Isolierung und Weiterzüchtung der Organismen genügte die Durchführung in der von TAUSSON angegebenen Form. Da sich die Benzolzer-setzer lediglich an der Oberfläche der Nährlösung in Gestalt einer langsam dicker werdenden Kahlhaut entwickeln, mußte das Verfahren, um für die Respirationmessungen genügende Mengen zu liefern, folgendermaßen abgeändert werden.

In den mittleren Schliff eines Dreihalskolbens (1000 ml) wird ein Tropftrichter eingesetzt, an dessen Auslauf ein 2 cm weites, nicht ganz bis zum Boden des Kolbens reichendes Glasrohr angeschmolzen ist (Abb. 1). Die beiden seitlichen Schläffe dienen zum Durchlaß der mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe durch die Nähr-

¹ 100 g Wasser lösen bei 20° C 0,181 g Benzol (HORIBA, Trans. Farad. Soc. 15, 144 (1920).

lösung gesaugten watefiltrierten Luft. Durch den Tropftrichter wird Benzol zu der im Kolben befindlichen Mineralsalzlösung (B) geleitet, wobei das Ansatzrohr ebenso wie bei der Taussonschen Anordnung die umgekehrte Petri-Schale, die Ausbreitung des Benzols (A) an der Oberfläche der Flüssigkeit verhindert. Durch die Belüftung wird ein gleichmäßiges Wachstum der Bakterien in der gesamten Nährlösung erzielt, und außerdem begünstigt die Rührwirkung der durchperlenden Luft das Eindiffundieren des Benzols, was ebenfalls die Entwicklung der Benzoloxydanten fördert.

Im folgenden werden wir, wenn von der ersten Methode die Rede ist, die Züchtungsapparatur als „TAUSSON-Topf“ bezeichnen und, wenn die zweite gemeint ist, vom „Belüftungskolben“ sprechen.

Für die Züchtung in Tausson-Töpfen hat sich folgende Nährlösung als die günstigste erwiesen: 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1 g K_2HPO_4 ; 1,25 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,5 g MgSO_4 ; 0,01 g CaCl_2 und 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ in 1000 ml Aqua dest. (pH 6,8). Bei den manometrischen Versuchen wurden die Ca- und Fe-Salze weggelassen. Als Benzol wurde kristallisierbares Benzol p. a. der Firma Merck (Darmstadt) verwendet.

II. Isolierung und Herkunft der verwendeten Organismen

Folgendes Islierungsverfahren hat sich am besten bewährt. Zur Anreicherung der gesuchten Organismen wurden Erdproben verschiedener Herkünfte mit Benzol übergossen und mehrere Wochen stehen gelassen. Mit je 2–3 Tropfen einer Aufschwemmung von derart vorbereiteten Erdproben wurde dann eine entsprechende Anzahl von Tausson-Töpfen beimpft. Da, wo sich nach einigen Tagen eine feine Haut gebildet hatte, wurde eine Öse in einen weiteren Tausson-Topf übertragen und dies noch einige Male wiederholt. Die eigentliche Reinzüchtung erfolgte dann in der üblichen Weise auf Bouillon-Agar (Standard II von Merck).

Den aktivsten Benzolersetzer erhielten wir aus einem mit Schweinemist frisch gedüngten, sandig-lehmigen Ackerboden. Mit diesem vorläufig als „Stamm M 5“ bezeichneten Organismus wurden die im folgenden zu beschreibenden Respirationmessungen durchgeführt. Obwohl Stamm M 5 in seinen morphologischen und physiologischen Eigenschaften weitgehend mit gewissen Stämmen saprophytischer *Mycobacterium*- und *Nocardia*-Arten übereinstimmt, war er doch keiner der bereits beschriebenen Arten einwandfrei zuzuordnen.

III. Nachweis und nähere Charakterisierung des Benzolabbaus

Die Tatsache, daß bestimmte Mikroorganismen fähig sind, sich auf einer benzolgesättigten wäßrigen Mineralsalzlösung zu vermehren, ist noch kein Beweis dafür, daß das Benzol als Kohlenstoffquelle verwertet wird. Es wäre auch denkbar, daß die Zellen lediglich gegen Benzol resistent sind und den Kohlenstoff nach Art der sogenannten oligocarbo-philien Actinomyceten (HIRSCH u. ENGEL 1956) den in der Laboratoriumsluft immer vorhandenen flüchtigen, organischen Verbindungen entnehmen. Schließlich könnte es sich auch um Organismen handeln, die Kohlendioxyd zu assimilieren vermögen.

Daß in einer mit unserem Stamm *M 5* beimpften, benzolhaltigen Nährlösung auch unter CO_2 -Ausschluß reichliche Zellvermehrung eintritt, ließ sich durch das Vorschalten zweier mit 50%iger KOH gefüllter Gaswaschflaschen vor die Watteflasche des Belüftungskolbens leicht nachweisen.

Dagegen läßt sich die Möglichkeit einer neben der Benzolverwertungs-fähigkeit bestehenden Oligocarbophilie nicht ganz ausschließen. Stamm *M 5* entwickelt auch auf Mineralsalzlösung ohne Benzolzugabe ein dünnes Häutchen, das sich allerdings, auch bei längerem Stehen, nicht mehr wesentlich verdickt.

Der exakte Nachweis des Benzolabbaus und seiner oxydativen Natur wurde durch Respirationsmessungen im Warburg-Apparat erbracht.

a) Methoden: Durch hochtouriges Zentrifugieren (etwa 20000 g) einer gut gewachsenen Belüftungskultur wurden die Organismen von der Nährlösung getrennt, zweimal mit einem m/15 Phosphatpuffer (pH 6) gewaschen und in der gleichen Pufferlösung suspendiert. Vor dem Einfüllen in die Gefäße wurden die Aufschwemmungen sorgfältig homogenisiert. Man erhält auf diese Weise Suspensionen gleichmäßiger Zelldichte, deren Medium abgesehen von Spuren von CO_2 keine Kohlenstoffverbindungen enthält.

Von dieser Suspension wurden jeweils 1,5 ml in den Hauptraum der Reaktionsgefäße (15 ml) gefüllt. In die Ansatzbirne kamen entweder 0,5 ml Benzolwasser (0,2% Benzol) oder bei den Leerversuchen das gleiche Volumen Wasser bzw. Pufferlösung. Registriert wurden die der Gasaufnahme bzw. Abgabe proportionalen Druckänderungen in Millimeter BRODIE (= Manometerflüssigkeit). Im allgemeinen war es nicht erforderlich, die abgelesenen Druckdifferenzen in die entsprechenden Gasvolumina umzurechnen. Bei allen Messungen wurde der Gasaustausch in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt. Die Thermostatemperatur betrug 25° C.

Das pH -Optimum für den Benzolabbau durch den Stamm *M 5* liegt zwischen pH 6,2 und pH 6,5. Die Respirationsmessungen wurden bei pH 6 durchgeführt, um die zu berücksichtigende Löslichkeit des CO_2 möglichst gering zu halten. Sie wurde nach Abschluß der Versuche gesondert bestimmt.

Um auszuschließen, daß es sich bei dem beobachteten Sauerstoffverbrauch um eine unter den vorliegenden Bedingungen homo- oder heterogen katalysierte nicht bakterielle Benzoloxydation handelt, wurde ein Blindwertgefäß jeweils mit einer vorher zum Sieden erhitzten und dadurch abgetöteten Bakteriensuspension beschickt.

Bei Atmungsversuchen mit flüchtigen Substanzen ist zu berücksichtigen, daß die Gasdruckänderungen im Reaktionsgefäß nicht allein vom Sauerstoff-Kohlendioxid-Austausch bestimmt werden. Quantitative Angaben sind daher immer mit einem gewissen Fehler behaftet. Wie jedoch aus dem Vergleich der am Thermomanometer abgelesenen Werte mit denen der Blindwertgefäße hervorgeht, ist in unserem Fall der Fehler so gering, daß er vernachlässigt werden kann.

b) Ergebnisse: Die Kurven in Abb. 2 stellen den Gasaustausch einer Suspension von auf benzolhaltiger Nährlösungen gewachsenem Stamm *M 5* dar und zwar mit und ohne Benzolzusatz während des Versuchs. Die Zeit Null entspricht dem Zeitpunkt des Vermischens des Benzolwassers bzw. der Pufferlösung mit der Bakteriensuspension. Nach der Benzolzugabe steigen Sauerstoffaufnahme (gemessen in —mm BRODIE) und Kohlendioxidaufgabe (+ mm BRODIE) rasch an. Nach

130 min wird die Kurve flacher und geht schließlich in eine Gerade über, die etwa derjenigen der Versuche ohne Benzolzusatz parallel läuft. Es ist anzunehmen, daß in dieser Zeit die zugesetzte Benzolmenge verbraucht ist und daß der danach noch zu beobachtende Gaswechsel, ebenso wie bei den Leerversuchen, auf endogener Atmung beruht. Da in den Suspensionen wegen des Fehlens einer Stickstoff-Verbindung im Medium keine nennenswerte Zellvermehrung stattfinden kann, ist die Geschwindigkeit des Gasaustausches im Bereich der Benzolatmung ebenso wie in dem der Leeratmung konstant, d. h. die Meßwerte liegen annähernd auf einer Geraden. Derartige Versuche wurden mehrfach wiederholt, stets grundsätzlich mit dem gleichen Ergebnis.

Die an den mit abgetöteten Bakterien beschickten Gefäßen abgelesenen Blindwerte deckten sich mit geringfügigen Abweichungen mit den vom Thermomanometer registrierten milieubedingten Druckschwankungen. Damit ist gezeigt, daß für den oxydativen Abbau des Benzols unter den gegebenen Versuchsbedingungen lebende Zellen erforderlich sind.

In einer weiteren Versuchsserie wurde geprüft, ob die Oxydationsvorgänge nach ihrem Abklingen durch einen neuerlichen Benzolzusatz wieder in Gang zu bringen sind, d. h. ob eine direkte Beziehung zwischen Benzolzusatz und O_2 -Aufnahme besteht (Abb. 3). Die Reaktionsgefäße (G_1 , G_2 und G_3) wurden mit je 1,5 ml Bakteriensuspension beschickt. Zur Zeit Null wurden 0,25 ml Benzolwasser mit der Suspension in G_1 und 0,5 ml mit der Suspension in G_2 vermischt und anschließend die Sauerstoffaufnahmen registriert. Das Gefäß G_3 diente als Leerversuch ohne Benzolzusatz. Nach 130 min wurden die Reaktionsgefäße geöffnet und nochmals zu G_1 0,25 ml und zu G_2 0,5 ml Benzolwasser zugesetzt. Das Verhältnis der zugeführten Benzolmengen in G_1 und G_2 betrug also

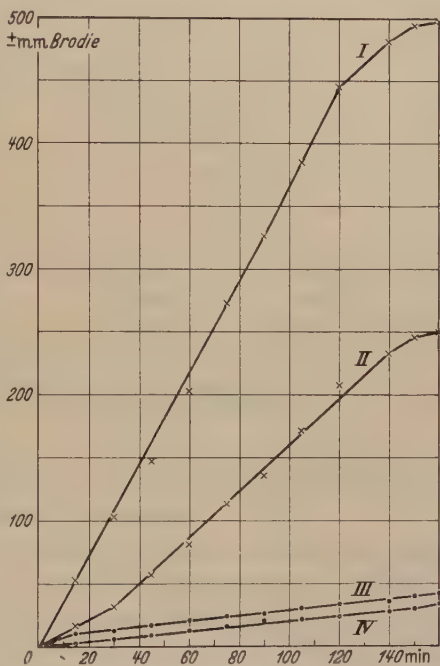


Abb. 2. Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydabgabe von mit (I u. II) bzw. ohne (III u. IV) Benzolzusatz atmenden Organismen des Stammes M 5.

I O_2 Aufnahme } mit Benzol
 II CO_2 Abgabe }
 III O_2 Aufnahme } ohne Benzol
 IV CO_2 Abgabe }

sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Benzolzugabe 1:2. Das Gefäß G_1 bekam schließlich 300 min nach Versuchsbeginn noch 0,5 ml Benzolwasser. Danach waren die insgesamt den beiden Gefäßen zugeführten Benzolmengen gleich.

Wie die graphische Darstellung in Abb. 3 zeigt, ist der Sauerstoffverbrauch der zugefügten Benzolmenge jeweils proportional. Die ent-



Abb. 3. Sauerstoffaufnahme nach zu verschiedenen Zeiten erfolgtem Zusatz verschiedener Mengen von Benzol zu Suspensionen des Stammes M_5

in den Benzolgefäßen rasch an, während die der endogenen Atmung entsprechende Kurve des Leerversuchs ihre Neigung beibehält. Es ist damit erwiesen, daß die maximale Aktivität gegenüber Benzol von „nicht adaptierten“ Zellen erst in einer „Adaptationszeit“ von mindestens einer halben Stunde erworben wird.

Das Ergebnis dieses Versuchs stimmt mit der Beobachtung überein, daß bei einer Beimpfung des Belüftungskolbens mit auf Nähragar gezüchteten Zellen die Trübung des Kolbeninhaltes ungefähr 36 Std später deutlich erkennbar ist als bei Verwendung bereits auf benzolhaltiger Lösung gewachsener Zellen. Ob es sich hierbei um eine „echte Adaptation“

sprechend den Benzolzusätzen zu erwartenden Verhältnisse der Sauerstoffaufnahmen stimmen mit den gemessenen Werten sehr gut überein. Auch dieser Versuch ist mehrmals wiederholt worden.

Aus diesen und den übrigen Ergebnissen der manometrischen Untersuchungen kann mit Sicherheit geschlossen werden, daß lebende Zellen des von uns isolierten M_5 -Stammes fähig sind, Benzol oxydativ abzubauen, und zwar in relativ kurzer Zeit.

Führt man die geschilderten Versuche mit Suspensionen des M_5 -Stammes durch, die vorher nicht in einer benzolhaltigen Mineralsalzlösung, sondern in einer gewöhnlichen Nährbouillon gezüchtet worden sind, dann sind die Werte für die Sauerstoffaufnahme in Benzol- und im Leerversuch zunächst gleich (Abb. 4). Erst nach etwa 30 min steigt die Sauerstoffaufnahme

handelt, insofern als die benzoloxydierenden Enzyme unter dem Einfluß des Substrats gebildet bzw. vermehrt werden, oder ob lediglich eine Auslese zum Benzolabbau befähigter Mutanten stattfindet, kann hier nicht entschieden werden.

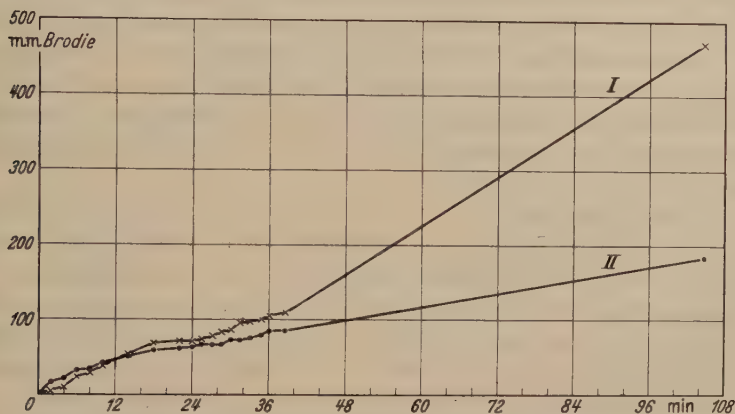


Abb. 4. Sauerstoffaufnahme von mit (I) bzw. ohne (II) Benzolzusatz atmenden, nicht an Benzol adaptierten Benzoloxydanten

IV. Versuche zur Aufklärung der am Benzolabbau beteiligten chemischen Reaktionen

Um den respiratorischen Quotienten des Benzolabbaus durch Stamm *M 5* zu bestimmen, haben wir vier Meßreihen durchgeführt, bei denen die Druckablesungen in die proportionalen Gasvolumina umgerechnet wurden. Der Fehler, der durch Verdampfungsverluste bei der Benzolzugabe zu erwarten ist, wurde durch besonders vorsichtiges und schnelles Arbeiten möglichst klein gehalten. Die erhaltenen RQ-Werte schwankten zwischen 0,6 und 0,7.

Da bei völliger Oxydation des Benzols 6 Mol Kohlendioxyd je 7,5 Mol verbrauchten Sauerstoffs gebildet würden (RQ 0,8), läßt unser Befund vermuten, daß kohlenstoffreichere Abbauprodukte als Endstufen der Benzoloxydation entstehen und wahrscheinlich auch in das Nährmedium ausgeschieden werden.

Um die vermuteten Abbauprodukte im Nährmedium analytisch nachweisen zu können, wurden aus 250 ml einer 3 Tage auf benzolhaltiger Nährlösung gewachsenen *M 5*-Kultur die Zellen durch Zentrifugieren abgetrennt und in 10 ml m/15 Phosphatpuffer (pH 6) suspendiert. Diese Suspension wurde dann nach Zusatz von 20 mg Benzol unter Luft geschüttelt, bis keine Sauerstoffaufnahme mehr zu beobachten war. Nach 14 Std wurde die Suspension durch hochtouriges Zentrifugieren

geklärt und der mit 30 ml einer 2 n Schwefelsäure angesäuerte Überstand im Perforator 48 Std mit Äther extrahiert.

Die papierelektrophoretische Untersuchung des Ätherextraktes¹ ergab drei, bei p_H 8,7 (Boratpuffer) zur Anode wandernde, also saure Substanzen², von denen die mittlere in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit mit zum Vergleich zugesetzter trans-trans-Muconsäure identisch war. Versetzte man einen Teil des Ätherextraktes und eine ätherische Lösung von trans-trans-Muconsäure bis zur Entfärbung mit Brom und stellte dann wieder den papierelektrophoretischen Vergleich an, so zeigte sich abermals Übereinstimmung in der Lage der bromierten Dicarbonsäuren.

Trans-trans-Muconsäure ist als Produkt des mikrobiellen Benzolabbaus vor einigen Jahren von KLEINZELLER u. FENCL (1952) nachgewiesen worden. Hierbei wurde mit einem aus Abwässern isolierten Organismus gearbeitet, den die Verff. als *Micrococcus sphaeroides* Gray u. Thornton bestimmt haben. Auf Grund der Beobachtung, daß Phenol und Brenzcatechin etwa gleich rasch, wenn auch langsamer als Benzol, von diesem Mikroorganismus oxydiert werden, kommen die Autoren zu dem Schluß, daß hier der Abbau in der Reihenfolge: Benzol \rightarrow Phenol \rightarrow Brenzcatechin \rightarrow cis-cis-Muconsäure \rightarrow trans-trans-Muconsäure verläuft.

Folgende Ergebnisse einer nach der Methode von STANIER (1947) durchgeführten Adaptationsanalyse lassen jedoch auf ein hiervon abweichendes Verhalten des von uns untersuchten Benzolzersetzers schließen. In mehreren Versuchsreihen wurde die Sauerstoffaufnahme von an Benzol adaptierten Zellsuspensionen in Gegenwart von Phenol, Brenzcatechin und Resorcin oder Hydrochinon gemessen und mit den bei Benzoloxydation erhaltenen Werten verglichen. Bei dem in Abb. 5 wiedergegebenen Versuch wurden zu je 2 ml Gesamtvolumen (= 1,5 ml Suspension + 0,5 ml der Lösung des Substrats in m/15 Phosphatpuffer p_H 6) 0,9 mg Benzol, 1,3 mg Brenzcatechin, 0,5 mg Phenol und 1,3 mg Hydrochinon zugesetzt.

Wie aus den Kurven der Abb. 5 ersichtlich ist, vermag eine an Benzol adaptierte Zellsuspension Brenzcatechin mit mindestens der gleichen Geschwindigkeit zu oxydieren wie Benzol (Kurve II). Phenol dagegen wird in den ersten 4 Std mehr als 10mal langsamer veratmet als Benzol, danach steigt die Kurve der Sauerstoffaufnahme an, erreicht aber nach 6 Std noch nicht diejenige der Benzolatmung (Kurve III). Bei Zugabe von Hydrochinon, als wenig wahrscheinlicher Zwischenstufe des Benzolabbaus, ist der Sauerstoffverbrauch anfangs der gleiche wie bei Phenol, seine Geschwindigkeit nimmt jedoch innerhalb der Versuchsdauer nicht zu (Kurve IV).

¹ Nach WIELAND u. PFLEIDERER (1955).

² Nachweis nach BINA u. KALAMAR (1956).

Verwendet man vorher abgetötete Suspensionen der Mikroorganismen, dann läßt sich bei keiner der untersuchten Substanzen eine Sauerstoffaufnahme feststellen.

Um Fehlschlüsse infolge der möglichen Toxizität der Phenole auszuschließen, wurde jedem Reaktionsgefäß nach Abschluß der Versuche

0,5 ml Benzolwasser zugesetzt und nunmehr die Benzolatmung der vorher den Phenolen ausgesetzten Organismen verfolgt. Wie den Kurven der Abb. 6 zu entnehmen ist, steigt der Sauerstoffverbrauch

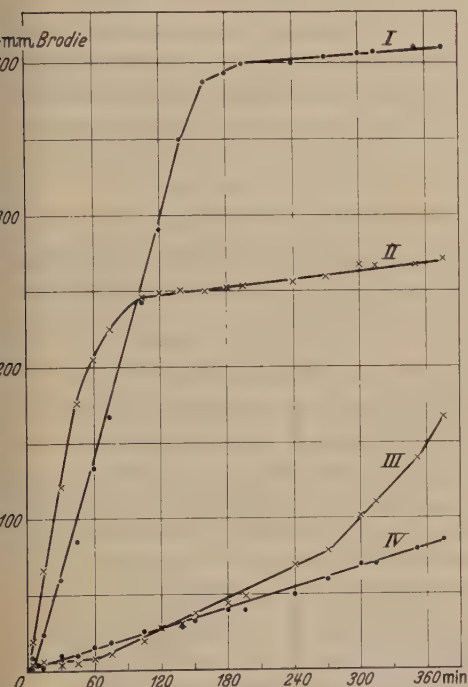


Abb. 5. Sauerstoffaufnahme von an Benzol adaptierten Organismen des Stammes *M 5* in Gegenwart von Benzol (I), Brenzcatechin (II), Phenol (III) und Hydrochinon (IV)

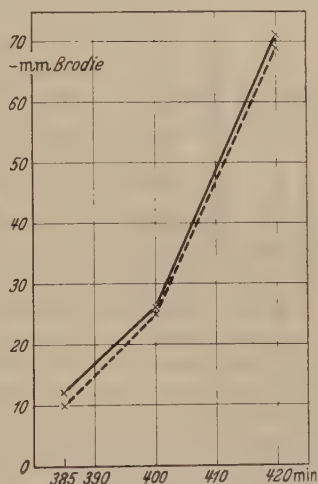


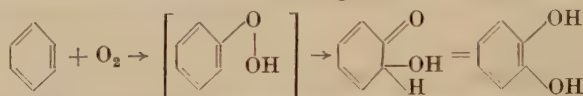
Abb. 6. Toxizitäts-Test. Benzoloxydation von Zellsuspensionen, die 385 min vor Beginn des Versuchs Benzol (—) bzw. Phenol (----) zugesetzt bekamen

in den Suspensionen, denen Phenol (oder Hydrochinon) zugesetzt war, fast ebenso schnell an wie in denjenigen, die vorher nur Benzol (oder Brenzcatechin) enthielten. Phenole in den angewandten Konzentrationen sind also nicht merkbar toxisch für die Zellen des *M 5*-Stammes. Eine Erhöhung der Phenolkonzentration auf das Doppelte hat allerdings eine Hemmung der Benzolatmung um etwa 50% zur Folge. Dies stimmt ungefähr überein mit den Angaben, die STANIER (1948) über die für *Pseudomonas fluorescens* toxische Phenolkonzentration gemacht hat (1 mg Phenol je ml Medium hemmt das Wachstum).

Aus den Ergebnissen unserer Adaptationsversuche kann, unter Verwendung der von STANIER (1947) ausführlicher erörterten Argumente, geschlossen werden, daß bei den von uns untersuchten Organismen

Brenzcatechin auf dem Weg des Benzolabbaus liegen dürfte, da es von benzoladaptierten Zellen mindestens ebenso rasch wie Benzol abgebaut wird. Infolgedessen ist es auch nicht gelungen, diese Verbindung als Zwischenprodukt des Benzolabbaus in den Zellen oder in der Kulturflüssigkeit nachzuweisen.

Das Auftreten von Phenol, als primärem Oxydationsprodukt des Benzols, erscheint hingegen wegen seiner schlechten Angreifbarkeit durch benzoladaptierte Zellen sehr unwahrscheinlich, so daß man eine direkte Oxydation des Aromaten zum zweiwertigen Phenol (Brenzcatechin) annehmen muß. Diese könnte z. B. folgendermaßen formuliert werden:



Die weitere Oxydation zur Muconsäure ist, analog der Brenzcatechin-oxydation durch ein Enzym aus *Pseudomonas fluorescens* (KATEGURI 1955), ebenfalls gut zu verstehen.

V. Versuche zur Extraktion einer Benzoloxydase

Wir haben zahlreiche Versuche angestellt, um zellfreie Extrakte mit benzoloxydierender Wirkung aus Kulturen des Stammes *M 5* zu gewinnen. Sie sind bisher durchweg negativ verlaufen.

Es wurden folgende Aufschlußverfahren an frisch abzentrifugierten Zellpasten und aktiven Gefrier- oder Aceton-Trockenpräparaten ausprobiert (HUGO 1954): Verreiben mit Kieselgur oder Aluminiumoxyd im Mörser oder Homogenisator; Beschallen von Suspensionen mit Ultraschall; Autolyse durch mehrmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen; Behandlung frischer und getrockneter Zellen mit Toluol, Benzol, Chloroform, n-Butanol oder Aceton; Einwirkung von Lysozym auf die feuchten Bakterien; Einwirkung hoher Drucke (10000 at/cm²) auf aktive Trockenpulver und Gemische frischer und getrockneter Zellen mit Kieselgur.

Bei der Mehrzahl dieser Verfahren gelang es nicht einmal die Zellen zu zerstören, wie sich durch mikroskopische Untersuchungen und durch Abimpfen auf ein frisches Nährmedium leicht nachweisen ließ. Lediglich das Zerreiben frisch abzentrifugierter Zellen mit Kieselgur oder Aluminiumoxyd unter Eis-Kochsalz-Kühlung in einem Homogenisator des ELVEHJEM-POTTER-Typs (2 g Zellen + 6 g Kieselgur in 5 ml Phosphatpuffer) lieferte nach dem Abzentrifugieren gelb bis orange gefärbte Lösungen, die einige Milligramm Protein je ml enthielten. Diese Lösungen zeigten jedoch im Warburg-Apparat nach Benzolzugabe keine Sauerstoffaufnahme. Nur wenn Brenzcatechin als Substrat gegeben wurde, war eine deutliche Sauerstoffaufnahme (90 ml O₂ je 1,2 mg Brenzcatechin in 150 min mit 0,2 ml Extrakt) zu beobachten, die nach Aufkochen der Enzymlösung unterblieb. Sie erreichte allerdings nicht den Wert der Sauerstoffabsorption intakter Zellen in Gegenwart von Brenzcatechin. Die Wirkung einer Phenoloxydase war hingegen nicht nachzuweisen.

Diese Befunde unterstreichen die durch Adaptationsanalyse mit intakten Zellen erhaltenen Ergebnisse bezüglich des Abbauwegs des Benzols.

Weiterhin konnte in den gelben Zellextrakten eindeutig die Wirkung einer Katalase nachgewiesen werden, die jedoch nicht näher untersucht wurde.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Isolierung und Züchtung benzolverwertender Mikroorganismen werden beschrieben.

Durch Respirationsmessungen im Warburg-Apparat wird nachgewiesen, daß Suspensionen des aus Gartenerde neu isolierten Stammes *M 5* fähig sind, Benzol in relativ kurzer Zeit oxydativ abzubauen.

Auf Nähragar gezüchtete Organismen des gleichen Stammes bedürfen (im Gegensatz zu auf benzolhaltiger Mineralsalzlösung herangewachsenen) einer Adaptationszeit von mindestens 30 min, bis die maximale Aktivität gegenüber Benzol erreicht ist.

Während der mikrobiellen Benzoloxydation ins Medium abgeschiedene trans-trans-Muconsäure konnte analytisch nachgewiesen werden.

Da Brenzcatechin von an Benzol adaptierten Organismen sofort, Phenol jedoch erst nach einer Adaptationszeit von 4—5 Std verwertet wird, erscheint der von KLEINZELLER u. FENCL (1952) für die Benzoloxydation durch *Micrococcus sphaeroides* vermutete Weg vom Benzol über Phenol zu Brenzcatechin und Muconsäure für den hier untersuchten Organismus unwahrscheinlich.

Es muß eine direkte Oxydation des Benzols zum zweiwertigen Phenol (Brenzcatechin) angenommen werden.

Versuche zur Extraktion einer Benzoloxydase schlugen fehl. Es konnte lediglich eine gelbliche, proteinhaltige Lösung gewonnen werden, in welcher neben Katalase eine Brenzcatechin-Oxydase, aber keine Phenol-Oxydase nachzuweisen war.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung der Untersuchungen.

Literatur

- BINA, K., u. K. KALAMAR: *Naturwissenschaften* **43**, 36 (1956). — CZEKALOWSKI, J. W., and B. SKARZYNSKI: *J. Gen. Microbiol.* **2**, 231 (1948). — EVANS, W. C.: *Biochemic. J.* **41**, 373 (1947). — GRANT, C. W., and C. E. ZOBELL: *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **51**, 206 (1944). — GRAY, P. H., u. H. G. THORNTON: *Zbl. Bakter. II*, **73**, 74 (1928). — HACCIUS, B., u. O. HELFRICH: *Arch. Mikrobiol.* **28**, 394 (1958). — HIRSCH, P., u. H. ENGEL: *Ber. Dtsch. Ges.* **69**, 441 (1956). — HUGO, W. B.: *Bacter. Rev.* **18**, 87 (1954). — KATAGARI, M.: *J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 5450 (1955). — KLEINZELLER, A., u. Z. FENCL: *Chem. Listy* **46**, 300 (1952). — MATTHEWS, A. J.: *Agr. Sci.* **14**, 1 (1924). — STANIER, R. Y.: *J. Bacter.* **54**, 339 (1947); **55**, 477 (1948). — STÖRMER, K.: *Zbl. Bakter. II* **20**, 282 (1908). — TAUSSON, W. O.: *Planta (Berlin)* **7**, 735 (1929). — TAUSZ, I., u. P. DONATH: *Hoppe-Seylers Z.* **190**, 141 (1930). — VIERLING, K.: *Zbl. Bakter. II*, **52**, 193 (1921). — WAGNER, R.: *Z. Gärungsphysiol.* **4**, 289 (1914). — WIELAND, TH., u. G. PFLEIDERER: *Angew. Chem.* **67**, 257 (1955). — ZOBELL, C. E.: *Adv. Enzymol.* **10**, 443 (1950).

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Mainz)

Untersuchungen zur mikrobiellen Benzoloxydation

II. Beschreibung und systematische Stellung benzolabbauender Mikroorganismen

Von

B. HACCUS und O. HELFRICH

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. September 1957)

Wie in der Einleitung des ersten Teils dieser Untersuchungen (WIELAND, GRISS u. HACCUS) näher ausgeführt wurde, gibt es zahlreiche Angaben über Mikroorganismen, die Phenol oder andere Benzolderivate abzubauen vermögen, aber relativ wenige Stämme, die allein oder zugleich auch fähig sind, unsubstituiertes Benzol anzugreifen (vgl. ZOBELL 1950).

Wir haben unter Verwendung eines von uns neu isolierten Stammes (Stamm *M 5*) den Abbauweg des Benzols näher zu analysieren versucht und sind dabei zu etwas anderen Ergebnissen gekommen als KLEINZELLER u. FENCL (1952), die mit einem als *Micrococcus sphaeroides* bezeichneten Organismus gearbeitet haben.

Da die Urheber der wenigen bisher untersuchten Fälle mikrobiellen Benzolabbaus (STÖRMER 1908; WAGNER 1914; VIERLING 1921; TAUSSON 1929; GRANT u. ZOBELL 1944) in keinem Fall vollständig beschrieben sind und es sich speziell bei *Micrococcus sphaeroides* um eine Art von zweifelhafter systematischer Stellung handelt (vgl. BERGEYS Manual, 6. Aufl., S. 275), bleibt die Frage offen, ob die Fähigkeit zum Benzolabbau Eigenschaft einer bestimmten systematischen Gruppe ist oder zerstreut innerhalb verschiedenster Verwandtschaftskreise vorkommt. Das letztere gilt sicher für den mikrobiellen Abbau des Phenols, der sowohl bei *Pseudomonas*-Arten als auch bei verschiedenen Vertretern der Gattungen *Mycobacterium* und *Nocardia* eindeutig nachgewiesen ist. Keiner der bisher untersuchten *Pseudomonas*-Stämme vermag jedoch Benzol anzugreifen.

Wir werden im folgenden zunächst eine ausführliche Beschreibung des von uns näher untersuchten Stammes *M 5* geben und zum Vergleich einen weiteren Mikroorganismus (Stamm *F 1*) heranziehen, bei dem wir ebenfalls eine, wenn auch etwas geringere Abbaufähigkeit gegenüber Benzol nachweisen konnten. Auf Grund des so gewonnenen Materials

und der sehr zerstreuten Angaben in der Literatur werden im zweiten Teil unserer Ausführungen die systematische Stellung der in Frage stehenden Organismen und ihre eventuelle Identität oder Verwandtschaft diskutiert.

I. Beschreibung der untersuchten Benzolzersetzer

Stamm M 5

Morphologie. In jungen Kolonien feine, mehr oder weniger gekrümmte und stark lichtbrechende Stäbchen, $0,3-0,5/3-9\ \mu$ (Abb. 1 I). Keine Eigenbeweglichkeit. Infolge des zunächst „winkligen“ Wachstums charakteristische V- und Y-Figuren. Verzweigungen sehr selten.

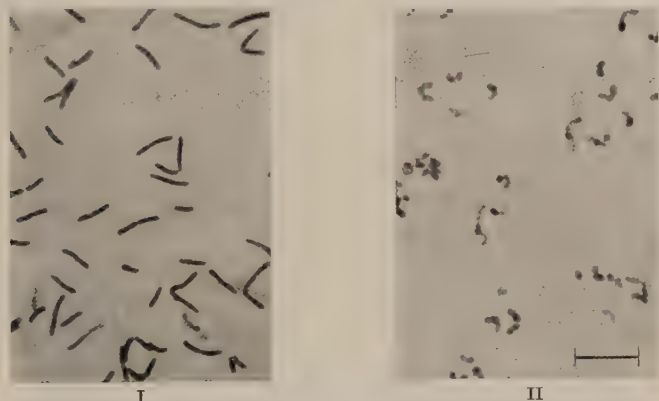


Abb. 1. *Nocardia spec.* Stamm M 5. Organismen einer 24 Stunden (I) und einer 3 Tage (II) alten Kultur, Färbung nach GRAM. Maßstrich = $10\ \mu$

In älteren Kulturen werden die Stäbchen kürzer, und nach 2—3 Tagen zerfallen sie in Kurzstäbchen und kokkoide Gebilde (Abb. 1 II), die häufig in ihrer ursprünglichen Anordnung in gebogenen Linien aneinander hängen bleiben. Gelegentlich findet man einzelne keulenförmig angeschwollene oder anders gestaltete Involutionsformen. Diese unterscheiden sich von den normalen kokkoiden Endstadien vor allem durch ihre Größe. Keine Sporenbildung.

Färbbarkeit. Gute Färbbarkeit sämtlicher Stadien. Grampositiv. Der Inhalt der Stäbchen färbt sich ungleichmäßig, besonders vor dem Zerfall. Die Stäbchen des frisch isolierten Stammes waren überwiegend säurefest (keine Entfärbung mit 5% iger H_2SO_4). Nach mehrmonatiger Kultur auf Nähragar ging die Säurefestigkeit verloren.

Kulturen auf verschiedenen Nährböden. *Nähragar* (Standard II von Merck): Gutes Wachstum. Kolonien mit matter, feinrunzeliger Oberfläche und unregelmäßigem, sich verästelndem Rand (Abb. 2). Leicht vom Nährboden abhebbar. Manchmal ist das Wachstum besonders üppig, die Kolonien sind dann glatt, feuchtglänzend und zusammenfließend. Farbe der Kolonien zunächst beigefarben, nach einigen Wochen hell lachsfarben. — *Nährbouillon*: Anfangs leichte Trübung,

später meist klar bleibend. Dicke schollige und an der Glaswand haftende Haut, beigefarbenes Sediment. — *Kartoffelkeile*: Gutes Wachstum, Kolonien erhaben mit matter Oberfläche, zuerst beigefarben, später bräunlich, stellenweise lebhaft rot. — *Malzagar*: Gutes Wachstum. — *Haferflockenagar*: Sehr spärliches Wachstum.

Fermentative Leistungen. *Gelatinestich*: Keine Verflüssigung. — *Lackmus-Milch*: Mäßiges Wachstum. Milch und p_H -Wert nicht merklich verändert (Beobachtungszeit 1 Woche). — *Blutagar*: Keine Hämolyse, keine Verfärbung.

Keine Indolbildung aus Tryptophan. — Keine Nitritbildung aus Nitrat. — Keine H_2S -Bildung. — Kein Gas und keine nennenswerte Säurebildung mit Glucose. Kein Gas und keine Säure mit Fructose, Maltose, Saccharose, Lactose, Mannit und Inosit. — Keine Stärkehydrolyse.

Verwertung von Benzol und Paraffin als Kohlenstoffquellen.



Abb. 2. *Nocardia spec.* Stamm *M 5*. Drei Tage alte Kolonie auf Bouillon-Agar. Vergr. $8 \times$

Sonstige Eigenschaften. Streng aerob. — Optimaler p_H -Wert bei Wachstum auf Nährbouillon 6,7—7. — Optimaler p_H -Wert bei Wachstum auf benzolhaltiger Mineralsalzlösung 6,3—6,6. — Optimale Temperatur: 21—22° C. Überlebt 55° C 15 min, 60° C 4 min und 65° C höchstens 1 min.

Sehr trockenresistent. Aus einem durch Gefriertrocknung oder durch Trocknung über P_2O_5 erhaltenen Pulver lassen sich lebenskräftige Kolonien abimpfen.

Das Wachstum wird in einer 2 ppm Penicillin G (Hoechst) enthaltenden Nährlösung gerade noch gehemmt.

Nicht pathogen für Meerschweinchen¹.

Herkunft. Frisch mit Schweinemist gedüngte, sandig-lehmige Ackererde des Botanischen Gartens der Universität Mainz.

Typus. Die Originalkultur des Stammes *M 5* wird in der mikrobiologischen Sammlung des Botanischen Instituts der Universität Mainz gehalten.

Stamm F 1

Der zweite Benzolersetzer, den wir als Stamm *F 1* bezeichnet haben, wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. U. WINKLER (Institut für Mikrobiologie der Universität Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Er ist

¹ Die Prüfung auf Pathogenität wurde freundlicherweise von Herrn Dr. J. ALBRECHT, Hygienisches Institut der Universität Mainz, durchgeführt.

aus zeitweise mit Abwässern der Firma Merck (Darmstadt) überschwemmter Erde isoliert worden.

Da uns die Eigenschaften des *F 1*-Stammes gut zu der in BERGEYS Manual (7. Aufl., S. 724) wiedergegebenen Beschreibung von *Nocardia corallina* (BERGEY et al.) WAKS. u. HENRICI zu passen schienen, haben wir eine uns liebenswürdigerweise von Frau Professor Dr. v. PLOTHO aus der Sammlung des Göttinger Mikrobiologischen Instituts zur Verfügung gestellte Kultur dieser Art zum Vergleich herangezogen.

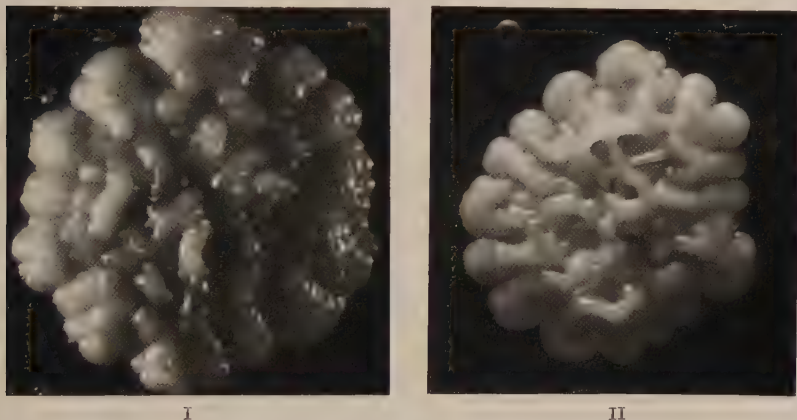


Abb. 3. I *Nocardia corallina* (Göttingen); II *N. corallina* Stamm *F 1*.
Drei Tage alte Kolonien auf Bouillon-Agar. Vergr. 10 ×

Bis auf die Fähigkeit zum Benzolabbau, die dem Göttinger Stamm fehlt, gleicht unser Stamm *F 1* diesem vollkommen. In Abb. 3 sind junge Kolonien der Göttinger *Nocardia corallina* (I) und unseres Stammes (II) wiedergegeben. Die Übereinstimmung in der Wachstumsweise ist deutlich. Charakteristisch sind die konzentrischen Ringe stärkerer Zellvermehrung und Färbung. (Man vgl. hierzu COMBES, KAUFFMANN u. VAZART (1957) über *Nocardia ivorensis*).

Von der in BERGEYS Manual hauptsächlich nach GRAY u. THORNTON (1928) zitierten Beschreibung weichen beide Stämme insofern ab, als frische und auch ältere Bouillonkulturen meist vollkommen klar bleiben, während in der genannten Beschreibung von *Nocardia corallina* die Bouillonkulturen als „usually turbid“ bezeichnet werden.

Trübung der Nährbouillon ist nach dem Zeugnis sämtlicher Bearbeiter der saprophytischen Mycobakterien und Nocardien ein Anzeichen für „bakterienartiges Wachstum ohne Mycelbildung“. Wir haben sowohl beim Göttinger als auch beim Stamm *F 1* in allen Nährmedien die mehr oder weniger ausgeprägte Bildung eines aus verzweigten Fäden bestehenden, kleinen und sehr hinfalligen Anfangsmycels beobachten können (Abb. 4 I). Ein solches ist für die Mehrzahl der *Nocardia*-Arten charakteristisch, nur ist es bei den *N. corallina* nahestehenden Vertretern besonders schwach ausgebildet.

Außerdem ist es durchaus möglich, daß bei *N. corallina* die Fähigkeit zu mycelartigem Wachstum und damit das Verhalten der Bouillonkulturen von Stamm zu Stamm variiert. Das gleiche gilt nach JENSEN (1931) von *Proactinomyces polychromogenes* (= *Nocardia polychromogenes*), wo er das Vorkommen konstanter R (= rod)- und F (= filament)-Varianten beschreibt.

Offenbar ist auch das Merkmal der Abbaufähigkeit gegenüber schwer angreifbaren Aromaten weitgehend variabel. Fast alle Phenol verwertenden *Mycobacterium agreste* (= *N. corallina*)-Stämme, die GRAY u. THORNTON (1928) nach entsprechender Bodenbehandlung isoliert hatten, verloren später diese Eigenschaft. Auch KLEINZELLER u. FENCL (1952) haben beobachtet, daß die Fähigkeit zum Benzolabbau nach längerer Kultur auf künstlichen Nährmedien verschwindet.

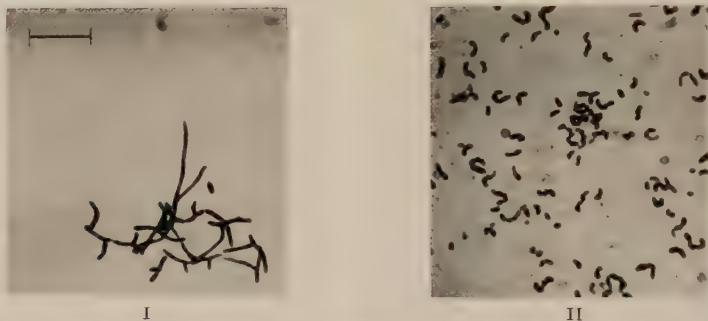


Abb. 4. *Nocardia corallina* Stamm F 1: Organismen einer 24 Stunden (I) und einer 3 Tage (II) alten Kultur, Färbung nach Gram. Meßstrich = 10 μ

Die Benzolverwertung, die unseren vor dem Göttinger Stamm auszeichnet, kann daher kein Gegenargument gegen die Auffassung liefern, daß es sich beim Stamm F 1 um eine benzolabbauende Variante von *Nocardia corallina* (Bergey et al.) Waks. et Henrici handelt. Die wichtigsten Synonyme sind: *Mycobacterium agreste* Gray et Thornton, *Proactinomyces corallinus* Jensen und *Mycobacterium rhodochrous* (Overbeck) Gordon et Mihm.

Eine ausführliche Aufzählung der von uns geprüften morphologischen und kulturellen Eigenschaften erübrigt sich. Es sei hier nur noch kurz auf die wichtigsten Unterschiede zwischen den beiden Benzolzersetzern Stamm M 5 und *Nocardia corallina* Stamm F 1 eingegangen. Beide zeichnen sich durch eine mehr oder weniger intensive Rotfärbung der Kolonien aus, während diese jedoch bei *N. corallina* früh und kräftig auftritt, wird sie beim Stamm M 5 zumeist nur an ziemlich alten Kulturen sichtbar.

Weitere Unterschiede sind, neben der bereits erwähnten Ausbildung eines Anfangsmycels bei *N. corallina*, deren unter den gegebenen Bedingungen fehlende Säurefestigkeit und wesentlich größere Hitzeresistenz. *N. corallina* überlebt eine Temperatur von 60° C 1 Std, 65° C 1½ Std, und erst 70° C sind bereits während der 1. min tödlich. v. PLOTHO (1950) hat unter den von ihr isolierten Proactinomyceten 3 Stämme beschrieben, die 60° 1 Std überlebten und die alle drei zu den Vertretern mit rotem Pigment gehörten. Eine für einen Nichtsporenbildner sehr hohe Widerstandsfähigkeit gegen Erhitzung geben auch KAUFFMANN, COMBES u. VASART (1957) für *Nocardia ivorensis* an.

Auch gegenüber der antibiotischen Wirkung von Penicillin G reagiert *N. corallina* weniger empfindlich als die Organismen des *M5*-Stammes. Die Zellvermehrung wird in einer 30 ppm Penicillin G (Hoechst) enthaltenden Nährbouillon gerade noch gehemmt.

II. Diskussion der systematischen Einordnung des untersuchten Benzolzersetzers (Stamm M 5)

Während der benzolverwertende *F1*-Stamm relativ leicht zu identifizieren war, ist die Zuordnung des Stammes *M 5* zu einer bereits beschriebenen Art nicht ohne weiteres möglich. Der für beide Stämme charakteristische Zerfall langer Stäbchen in Kurzstäbchen und kokkoide Formen (Abb. 1 II und Abb. 4 II) verweist auch den *M 5*-Stamm in die Ordnung der *Actinomycetales*, in welcher BUCHANAN (1917) die Gattungen *Corynebacterium*, *Mycobacterium* und *Actinomyces* zusammengefaßt hat.

Nach WAKSMAN u. HENRICI (BERGEYS Manual, 7. Aufl., S. 694) werden neuerdings die Familien *Mycobacteriaceae* Chester, *Actinomycetaceae* Buchanan und *Streptomycetaceae* Waksman weiter in der Ordnung der *Actinomycetales* Buchanan zusammengefaßt, während die *Corynebacteriaceae* Lehm. et Neum. trotz ihrer, unseres Erachtens, sehr nahen Beziehungen zu den *Mycobacteriaceae* (vgl. JENSEN 1934 u. 1952, UMBREIT 1939, CONN u. DIMMICK 1947 sowie MÜLLER 1957) aus der Ordnung der *Actinomycetales* herausgenommen und zu den *Eubacteriales* gestellt werden.

Unser Stamm *M 5* hat zwar morphologisch große Ähnlichkeit mit einigen der von JENSEN beschriebenen saprophytischen Corynebakterien. Da diese jedoch sämtlich als nicht säurefest beschrieben werden und häufig Proteasen bilden, verschiedene Zucker gut vergären und in keinem Fall Paraffin verwerten (HAAG 1927 und JENSEN 1934), kommt die Gattung *Corynebacterium* für die Einordnung des beschriebenen Benzolzersetzers kaum in Frage.

Auch die *Streptomycetaceae* können von vornherein außer Betracht bleiben, da der Stamm *M 5* keinerlei Mycelbildung, auch nicht wie *N. corallina* ein hinfalliges Anfangsmycel, aufweist. Damit bleiben als Möglichkeiten für die systematische Einordnung nur noch die *Mycobacteriaceae* und unter den *Actinomycetaceae* die im Gegensatz zu *Actinomyces* Harz überwiegend saprophytische und *Mycobacterium* nahe stehende Gattung *Nocardia* Trevisan.

JENSEN (1931 und 1932) hat für die in ihren Eigenschaften zwischen den Mycobakterien und den Actinomyceten stehenden Formen mit in Stäbchen und kokkoide Formen zerfallendem Anfangsmycel die (unseres Erachtens sehr glückliche) Gattungsbezeichnung *Proactinomyces* vorgeschlagen. WAKSMAN u. HENRICI haben in der 6. u. 7. Aufl. von BERGEYS Manual aus Gründen der Priorität *Nocardia* Trevisan vorgezogen.

Innerhalb der Gattung *Nocardia* (= *Proactinomyces*) interessiert in bezug auf unseren Benzolersetzer vor allem die den Mycobakterien am nächsten stehende Gruppe, zu welcher auch *N. corallina* gehört. Es handelt sich dabei um das Subgenus I A nach JENSEN (1932), welches *Proactinomyces ruber* nach KRASSOLNIKOW (1938) bzw. α -*Proactinomyces* nach UMBREIT (1939) entspricht. Hierzu gehören alle teilweise säurefesten nicht proteolytischen und nicht diastatischen, schwer angreifbare Kohlenwasserstoffe und Heterocyclusen verwertenden Proactinomycceten mit kleinem, rasch zerfallendem Anfangsmycel und bakterienartigem Wachstum.

Sämtliche Bearbeiter sind sich darin einig, daß fließende Übergänge zwischen diesen am wenigsten differenzierten Proactinomycceten und den Mycobakterien bestehen, sie differieren jedoch in ihren Ansichten darüber, an welcher Stelle und auf Grund welcher Merkmale die Grenze zu ziehen sei.

JENSEN hat das Vorhandensein bzw. Fehlen eines, wenn auch noch so rudimentären Anfangsmycels als Unterscheidungsmerkmal vorgeschlagen, worin ihm WAKSMAN u. HENRICI gefolgt sind. Während jedoch JENSEN (1931) anlässlich einer Diskussion der systematischen Stellung von *Mycobacterium coeliacum* die Abtrennung auf Grund dieses Merkmals konsequent durchführt, stellen WAKSMAN u. HENRICI lediglich *Mycobacterium smegmatis* (= *M. lacticola*) und *Mycobacterium phlei* zur Gattung *Mycobacterium* Lehm. et Neum., während alle übrigen als Mycobakterien beschriebenen bodenbewohnenden Saprophyten ohne Berücksichtigung der Mycelausbildung der Gattung *Nocardia* Trevisan (*Actinomyccetaceae*) zugeordnet werden. Auf diese Weise werden nächstverwandte Organismen nicht nur zu verschiedenen Gattungen, sondern sogar zu verschiedenen Familien gestellt.

Da die Eigenschaften des Stammes *M* 5 seine Einordnung sowohl unter *Mycobacterium* als auch unter *Nocardia* rechtfertigen würden, ist es nötig, noch etwas näher auf die Problematik dieser auch in der 7. Aufl. von BERGEYS Manual durchgeführten Gruppierung einzugehen.

Es läßt sich kein Merkmal finden, das die beiden Saprophyten, *Mycobacterium phlei* und *M. lacticola*, befriedigend von den *Nocardia*-Arten mit hinfälligem Anfangsmycel trennt. Strikte Säurefestigkeit, wie sie allgemein für die Gattung *Mycobacterium* als charakteristisch gilt, ist weder bei *M. lacticola* noch bei *M. phlei* gegeben, beides Arten, die sich in ihrer teilweise fehlenden Säurefestigkeit nicht wesentlich von *Nocardia*-Arten wie z. B. *N. coeliaca* (= *Mycobacterium coeliacum* Jensen) unterscheiden (vgl. ERIKSON 1949).

Auch im Grad der Ausbildung eines aus verzweigten Fäden bestehenden Anfangsmycels sind, wie am Beispiel von *N. corallina* näher ausgeführt wurde, fließende Übergänge zu beobachten. Bekanntlich haben

alle Mycobakterien unter bestimmten Kulturbedingungen eine mehr oder weniger ausgeprägte Tendenz, verlängerte Zellen mit Verzweigungen zu bilden, während einige neuerdings zu *Nocardia* gestellte Arten, wie z. B. *N. rubropertincta* meistens ein Anfangsmycel vermissen lassen. Damit fällt aber auch das mit der Mycelbildung im Zusammenhang stehende Klarbleiben oder Trübwerden von Bouillonkulturen als Unterscheidungsmerkmal aus.

In Anbetracht dieser Schwierigkeiten sind Untersuchungen von BISSET u. MOORE (1949) und vor allem eine neuerdings erschienene Arbeit von GORDON u. MIHM (1957) von Bedeutung. Die zuletzt genannten Verfasserinnen haben 676 Stämme untersucht, die sie aus verschiedenen Sammlungen und Laboratorien unter den Gattungsnamen *Mycobacterium*, *Nocardia* und *Streptomyces* bekommen hatten. Sämtliche *Mycobacterium*-Stämme bildeten, wenn überhaupt, lediglich ein brüchiges, rasch in Stäbchen und kokkoide Formen zerfallendes Mycel ohne Lufthyphen, 92% der *Streptomyces*-Stämme hatten ein bleibendes Mycel mit Lufthyphen. Bei den als zur Gattung *Nocardia* gehörig identifizierten Arten verhielten sich 18% wie *Mycobacterium* und 81% wie *Streptomyces*, nur 1% nahm eine Zwischenstellung ein.

Ebenso wie BISSET u. MOORE (1949) kommen die Verfasserinnen zu dem Ergebnis, daß die Gattung *Nocardia* heterogen sei. Sie schlagen vor, die zur Zeit unter dem Gattungsnamen *Nocardia* registrierten Formen mit mycobacteriumartigem Wachstum wieder mit *Mycobacterium* zu vereinigen.

Wenn wir dem in BERGEYS Manual durchgeführten Vorgehen von WAKSMAN u. HENRICI folgen, müssen wir unseren Stamm *M* 5 in die Gattung *Nocardia* stellen, wo er zusammen mit *N. minima*, *N. corallina*, *N. globerulea*, *N. salmonicolor*, *N. rubropertincta*, *N. rubra* und *N. coeliaca* eine Gruppe nächstverwandter Organismen bildet, die sich durch ein mehr oder weniger intensives rötliches Pigment, durch mycobacteriumartiges Wachstum und durch die Fähigkeit frisch isolierter Stämme, schwer angreifbare Kohlenwasserstoffe zu verwerten, auszeichnen.

Zu dieser Gruppe gehört auch zweifellos ein Teil der Heterocyclen abbauenden Organismen, auf die RIPPET-BALDES, STARC u. KÖHLER (1943) aufmerksam gemacht haben, wie z. B. die von HORVATH (1943) neu beschriebene, Pyridin verwertende Art *Proactinomyces roseus*. Weiterhin besteht auch engste Verwandtschaft mit *Mycobacterium phlei*.

Die Frage, wieweit die starke Aufgliederung dieser Gruppe in Arten überhaupt gerechtfertigt ist, muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Aus diesem Grund und wegen der unseres Erachtens berechtigten Einwände von GORDON u. MIHM (1957) gegen die Zuordnung der in Frage stehenden, zum Teil ursprünglich als *Mycobacterium* beschriebenen

Arten zur Gattung *Nocardia* halten wir es für richtig, dem bei unseren Untersuchungen verwendeten Benzolersetzer vorläufig die Bezeichnung „*Nocardia spec. Stamm M 5*“ zu geben und für die eventuelle Festsetzung eines Artnamens die weitere Entwicklung der Systematik von *Mycobacterium* und *Nocardia* abzuwarten.

Es bleibt nun noch zu untersuchen, ob bei den aus der Literatur bekannten Fällen von mikrobiellem Benzolabbau ebenfalls ein der *Nocardia corallina*-Gruppe nahestehender Organismus vorgelegen haben könnte. Während es sich bei den von WAGNER (1914), VIERLING (1921) sowie GRANT u. ZOBELL (1944) beschriebenen Benzolsetzern, nach den Angaben der Verfasser, vermutlich um den saprophytischen Mycobakterien bzw. Nocardien nahestehende Organismen gehandelt hat, muß das Taussonsche *Bacterium toluolicum* c ausgenommen werden. Nach der Beschreibung des Autors haben lange, feine und bewegliche Stäbchen vorgelegen, die sich nach Gram entfärbten.

Ebenfalls problematisch ist die Identifizierung des von KLEINZELLER u. FENCL (1952) untersuchten Benzolsetzers als *Micrococcus sphaeroides*. Dieser von GRAY u. THORNTON (1928) aus Erde isolierte und als neue Art beschriebene Mikroorganismus zeichnet sich laut Beschreibung der Verfasser dadurch aus, daß auf 5 Tage alten Schrägröhrchen die Mehrzahl der Zellen kokkoid sei, während in weniger als 24 Stunden alten Bouillonkulturen bis zu 6 μ lange Stäbchen vorkämen. Der hier offensichtlich vorliegende Zerfall von Stäbchen in kokkoide Formen dürfte eine Zuordnung zur Gattung *Micrococcus* Cohn nach heutigen Begriffen ausschließen. Andererseits spricht das gramnegative Verhalten gegen eine Verwandtschaft mit *Mycobacterium* oder *Nocardia*.

Zusammenfassend können wir feststellen, daß die Eigenschaft, schwer angreifbare Kohlenwasserstoffe, wie Paraffine oder Benzolderivate, als Kohlenstoffquelle verwerten zu können, für eine *Nocardia corallina* nahestehende Gruppe von Mikroorganismen charakteristisch, aber nicht auf diese beschränkt ist. Ob jedoch speziell die Fähigkeit zum Abbau unsubstituierten Benzols ebenfalls bei Vertretern anderer Verwandtschaftskreise vorkommt, erscheint uns, trotz der zitierten Angaben bei TAUSSON sowie KLEINZELLER u. FENCL fraglich. Das spärliche bisher vorliegende Material reicht für eine Entscheidung nicht aus.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Die morphologischen und physiologischen Eigenschaften zweier aus Erde neu isolierter benzolabbauender Mikroorganismen werden beschrieben.

Während der eine (Stamm *F 1*) ohne Schwierigkeiten mit *Nocardia corallina* (Bergey et al.) Waks. et Henrici identifiziert werden kann, handelt es sich bei dem anderen um eine vermutlich neue Art des gleichen

Verwandtschaftskreises, der aus Gründen, die ausführlich diskutiert werden, die Bezeichnung *Nocardia* spec. Stamm *M 5* gegeben wird.

Der Vorschlag von GORDON u. MIHM (1957), die *Nocardia corallina* nahestehende Gruppe von teilweise säurefesten, nicht proteolytischen und nicht diastatischen Arten mit rasch zerfallendem oder fehlendem Anfangsmycel und bakterienartigem Wachstum aus der Gattung *Nocardia* herauszunehmen und wieder mit *Mycobacterium* zu vereinigen, wird befürwortet.

Die Fähigkeit, schwer angreifbare Kohlenwasserstoffe wie Paraffine und Benzolderivate sowie Heterozyklen als Kohlenstoffquelle zu verwerten, ist für diese Gruppe charakteristisch, aber nicht auf sie beschränkt.

Literatur

- BISSET, K. A., and F. W. MOORE: J. Gen. Microbiol. **3**, 387 (1949). — BREED, R. S., E. G. D. MURRAY and A. P. HITCHENS: BERGEYS Manual of Determinative Bacteriology. 6. Aufl., Baltimore 1948. — BREED, R. S., E. G. D. MURRAY and N. R. SMITH: BERGEYS Manual of Determinative Bacteriology. 7. Aufl. Baltimore 1957. — BUCHANAN, R. E.: J. Bacter. **2**, 162 (1917). — COMBES, R., J. KAUFFMANN et B. VAZART: C. r. Acad. Sci. (Paris) **244**, 1582 (1957). — CONN, H. J., and I. DIMMICK: J. Bacter. **54**, 291 (1947). — ERIKSON, D.: J. Gen. Microbiol. **3**, 361 (1949). — GORDON, R. E., and J. M. MIHM: J. Bacter. **73**, 15 (1957). — GRANT, C. W., and C. E. ZOBELL: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **51**, 206 (1944). — GRAY, P. H. H., u. H. G. THORNTON: Zbl. Bakter. II **73**, 74 (1928). — HAAG, F. E.: Zbl. Bakter. II **71**, 1 (1927). — HORVATH, J. v.: Arch. Mikrobiol. **13**, 373 (1943). — JENSEN, H. L.: Proc. Linnean Soc. N. S. Wales **56**, 79, 201 u. 345 (1931); **57**, 364 (1932); **59**, 19 (1934); Ann. Rev. Microbiol. **6**, 77 (1952). — KAUFFMANN, J., R. COMBES et B. VAZART: C. r. Acad. Sci. (Paris) **244**, 822 (1957). — KLEINZELLER, A., and Z. FENC: Chem. Listy **46**, 300 (1952). — KRASSILNIKOV, N. A.: Bull. Acad. Sc. URSS, Ser. Biol. **1**, 51 (1938). — MÜLLER, J.: Arch. Mikrobiol. **27**, 105, (1957). — PLOTTO, O. v.: Arch. Mikrobiol. **14**, 12 (1950). — RIPPPEL-BALDES, A., A. STARC u. W. KÖHLER: Arch. Mikrobiol. **13**, 365 (1943). — STÖRMER, K.: Zbl. Bakter. II **20**, 282 (1908). — TAUSSON, W. O.: Planta (Berlin) **7**, 735 (1929). — UMBREIT, W. W.: J. Bacter. **38**, 73 (1939). — VIERLING, K.: Zbl. Bakter. II **52**, 193 (1921). — WAGNER, R.: Z. Gärungsphysiol. **4**, 289 (1914). — WAKSMAN, A. A., and A. T. HENRICI: Actinomycetaceae Buchanan. In BERGEYS Manual, 6. u. 7. Aufl., Baltimore 1948 u. 1957. — WIELAND, TH., G. GRISS u. B. HACCUS: Arch. Mikrobiol. **28**, 383 (1958). — ZOBELL, C. E.: Adv. Enzymol. **10**, 442 (1950).

(Aus dem Institut für Allgemeine Botanik der Friedrich-Schiller-Universität, Jena*)

Morphologische Untersuchungen zur Frage der Rassenbildung bei *Helminthosporium papaveris* Saw.

Von

MARTIN SCHMIEDEKNECHT

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. August 1957)

Die Helminthosporiose des Ölmohns (*Papaver somniferum*), vor Jahren in Nordwesteuropa noch eine unbekannte Infektionskrankheit, hat in der letzten Zeit rasch an Umfang zugenommen. Alle Versuche, durch chemische Mittel der Krankheit Herr zu werden, sind bis jetzt fehlgeschlagen (BARBACKA 1935, CHRISTOFF 1943 und 1946). Um nicht auf den Mohn als Ölpflanze verzichten zu müssen, wird es notwendig werden, durch Züchtung resistenter oder immuner Sorten zum Ziel zu kommen. Es ist deshalb wichtig, Differenzierung, Verbreitung und Variation morphologischer und physiologischer Rassen des Erregers zu kennen.

CHRISTENSEN u. GRAHAM (1934) unterschieden bei etwa 1200 Einsporisolationen von *Helminthosporium gramineum* aus der alten und neuen Welt vorläufig 125 definierbare Rassen, die sich in der Septierung und im Ausmaß ihrer Conidien, in ihrem Wuchs und in ihrer Farbe auf bestimmten Nährböden unterscheiden. Die Verff. kamen zu dem Schluß, daß die Zahl der Rassen durch weitere Isolationen noch fast beliebig vergrößert werden kann. Auch von anderen *Helminthosporium*-Arten (DRECHSLER 1923; ROBERT 1952; ULLSTRUP 1954) liegen Untersuchungen vor, die eine Zersplitterung der Arten in Rassen beweisen.

Auf die Möglichkeit einer Aufspaltung in verschiedene Biotypen bei *Helminthosporium papaveris* hat MEFFERT 1950 schon hingewiesen. Auch BALLARIN (1950) kam zu derselben Vermutung. Über einen experimentellen Nachweis der Rassendifferenzierung des Pilzes ist aber bisher nichts bekannt geworden. Ziel der vorliegenden Abhandlung ist die Feststellung des Vorkommens und der Verbreitung morphologisch unterscheidbarer Rassen des Pilzes *Helminthosporium papaveris* und Untersuchung ihrer Stabilität auf künstlichen Nährböden.

Untersuchungsmaterial und -methode

Erfahrungsgemäß sind Rassenunterschiede am ehesten bei Prüfung von Sporenherkünften aus geographisch voneinander entfernten Gebieten zu erwarten.

* Direktor: Prof. Dr. HANS WARTENBERG.

Es sind deshalb aus verschiedenen voneinander weit entfernten Gegenden kranke Mohnpflanzen besorgt worden, wobei auch auf Gebirgs- oder Tallage und Klimaverhältnisse geachtet wurde. Ferner standen Samenproben verschiedener *Papaver*-Arten aus 12 europäischen Staaten zur Verfügung; war hier die Möglichkeit, den Erreger anzutreffen, gering, da ja nur ausgewählt gesundes Saatgut zum Versand kommt, so gelangen doch bei Saatgut aus Belgien 1 Isolierung (von *Papaver somniferum*), Dänemark 2 Isolierungen (*P. monstrosum* und *P. somn.*), Deutschland 164 Isolierungen (verschiedene *Papaver*-Arten und Zuchtsorten), England 2 Isolierungen (*P. argemone* und *P. somn.*), Holland 3 Isolierungen (*P. rhoeas* und *P. somn.*), Polen 2 Isolierungen (*P. herneri* und *P. somn.*) und aus Rumänien 1 Isolierung (*P. setigerum*).

Die Samen oder auch Kapselteile wurden in sterilen Petri-Schalen auf feuchtem sterilen Filtrierpapier ausgelegt und bei Zimmertemperatur gehalten. Nach 2 bis 3 Tagen setzte die Pilzentwicklung ein. Mit dem Mikroskop wurden die Samen dann in der feuchten Kammer durchgemustert und die mit *Helminthosporium* befallenen Körner auf Malzagar übertragen.

Selbstverständlich entwickelten sich in den Mohnproben, die in feuchten Kammern ausgelegt wurden, neben *Helminthosporium papaveris* eine größere Anzahl immer wiederkehrender Pilze, z. B. *Alternaria brassicae* var. *somniferi*, *Botrytis* sp., *Cladosporium herbarum*, *Trichothecium roseum*, *Rhizopus* sp. und andere *Phycomyceten*, *Penicillien*, *Aspergillen* und *Macrosporium* sp. Ein einziges Mal wurde aus einer Kapsel neben *Helm. papaveris* ein anderes *Helminthosporium* isoliert, das nach NISIKADO in die Gruppe *Euhelminthosporium* zu stellen ist, während *Helm. papaveris* zu der Untergattung *Cylindrohelminthosporium* gehört. Wiederholte Versuche zur Infektion von *Papaver*-Keimlingen fielen mit diesem Stamm negativ aus. Sein Vorkommen in der Probe wird wohl zufällig gewesen sein und nicht aus einem parasitären Verhältnis herrühren.

Nach einer Trennung von Begleitorganismen wurden von den erhaltenen Kolonien rund 170 Einsporisierungen hergestellt, wovon nach Abzug einiger Verluste 119 Stämme übrig blieben, die fortlaufend numeriert das Material für meine Untersuchungen darstellten. Traten in einer Kultur Varianten auf, so wurden Abimpfungen davon mit der Nummer der Ausgangskultur mit einem lateinischen Buchstaben bezeichnet, z. B. 29-a. Bei Stämmen, die aus Ascosporen bekannter Herkunft erhalten wurden, trat vor die Stamm-Nummer ein H.

Trotz bestimmten Unterschieden, die, wie gezeigt werden wird, bei den Stämmen auftreten, haben sie einiges gemeinsam: Alle parasitieren auf *Papaver*-Arten — sie sind ja von solchen isoliert worden — haben als Conidienform die typische *Cylindrohelminthosporium*-Form wechselnder Größe und Septierung. Als Hauptfruchtform haben sie ein nacktes Perithecium vom *Pleospora*-Typ mit 8 gekammerten Ascosporen in einem Schlauch. Die Oberflächenhyphen des hyalinen bis bräunlichen Mycels wachsen stets bogenförmig gegen die Uhrzeigerichtung. Im Alter bilden sie Chlamydosporen, und alle Rassen bilden mehr oder weniger einen grünen bis schwarzen Farbstoff. Folglich können alle Isolierungen als zu der Art *Helminthosporium papaveris* gehörend betrachtet werden, weil die Art für die genannten gemeinsamen Merkmale beschrieben ist.

Da vermutet wurde, daß sich der Pilz auch im Innern des Kernes befindet, wurden Querschnitte von Mohnsamen aus befallenen Kapseln

hergestellt und mit Anilinblau gefärbt (BELL 1951). Die Untersuchung ergab, daß der Pilz in Hyphenform hauptsächlich zwischen der Querszellen- und Netzzellenschicht der Samenschale (SCHWEIZER 1931) anzutreffen ist. Besonders viel Hyphen sind in der Nähe des Hylums zu finden, einige wenige auch im Endosperm.

Versuche und Ergebnisse

Morphologische Unterschiede der Conidien

CHRISTENSEN (1922), HENRY (1924), GREANY u. BALLEY (1927) sowie MITRA (1931) fanden beträchtliche Unterschiede in der Länge, Breite und Septenzahl der Conidien, die von Rassen verschiedener *Helminthosporium*-Arten gebildet werden. RAVN (1900), DRECHSLER (1923) und andere berichten ebenfalls über eine große Variabilität der Conidien von *Helm. gramineum*, die sich nach den Untersuchungen von CHRISTENSEN u. GRAHAM (1934) als rassenspezifisch erwies. Dasselbe ist anscheinend bei *Helm. papaveris* der Fall, denn in der Literatur divergieren die Angaben über Sporengröße und Septenzahl beträchtlich. MEFFERT (1950) unterscheidet bei der Prüfung der Conidien von 25 Stämmen eindeutig sieben morphologisch differenzierbare Rassen. Es erschien also lohnenswert, diese Untersuchungen auf eine größere Zahl von *Helminthosporium*-Herkünfte auszudehnen.

Tabelle 1. *Conidiengrößen eines Stammes von Helm. papaveris bei Kulturen auf verschiedenen Nährböden*

Stamm Nr.	Conidiengröße auf		
	Malzagar μ	Mohndekotagar μ	Mohnsamen μ
7	29,2 \times 7,1	30,1 \times 7,2	39,3 \times 8,8
58	24,2 \times 9,6	21,5 \times 8,1	30,0 \times 10,0
32	23,5 \times 6,3	23,6 \times 6,3	30,2 \times 7,6
33	29,7 \times 7,9	30,1 \times 8,0	32,4 \times 9,1
101	30,5 \times 7,1	28,9 \times 6,8	33,4 \times 8,0
84	30,0 \times 7,5	29,1 \times 7,2	37,5 \times 8,9

Von den untersuchten Stämmen wurde von je 100—200 Conidien die Länge und Breite gemessen sowie ihre Septenzahl gezählt. Die zur Messung bestimmten Conidien sind unter gleichmäßigen Bedingungen auf Mohnsamen herangezogen worden, da sich die Angabe von MEFFERT (1950) und auch BALLARIN (1950) bestätigt hat, daß die in Kultur gebildeten Conidien kleiner sind als die, die auf natürlichem Substrat entstanden sind (Tab. 1). Es wurde das arithmetische Mittel M , der mittlere Fehler m und die Standardabweichung σ errechnet. Der Unterschied von 2 Stämmen wurde als gesichert angesehen, wenn die Differenz der Mittelwerte größer als der 3fache zugehörige Fehler war.

Zur Kontrolle wurden zu einem späteren Zeitpunkt die Conidien des Stammes 108 noch einmal gemessen. Der Wert ließ sich sehr gut reproduzieren (Tab. 2).

Tabelle 2. Vergleich der Conidienmessungen des Stammes 108 im Zeitabstand von 10 Monaten unter sonst gleichen Bedingungen

Datum	18. 11. 1952	22. 9. 1953
Stamm	108	108
Anzahl der gemessenen Conidien	200	138
Länge (Mittelwert)	$46,80 \pm 0,14 \mu$	$46,69 \pm 0,2 \mu$
Breite (Mittelwert)	$8,12 \pm 0,003 \mu$	$8,13 \pm 0,008 \mu$
Septenzahl (Mittelwert)	$4,1 \pm 0,34$	$4,0 \pm 0,39$

In Tab. 3 sind die statistisch gesicherten Werte der Conidienlängen und der Conidienbreiten sowie die Septenzahlen der Conidien einer großen Anzahl isolierter Stämme des *Helm. papaveris* zum Vergleich zusammengestellt. Es ist leicht zu erkennen, daß die Stämme charakteristische Conidienlängen haben und daß die Variabilität der Conidienlängen innerhalb der Art in einer großen Streubreite eine große Anzahl von Rassen bedingt; wobei wieder darauf hingewiesen werden muß, daß

Tabelle 3. Variabilität der Conidienlängen, der Conidienbreiten und der Septenzahlen einer Anzahl Stämme von *Helm. papaveris*

Stamm	Länge M \pm m in μ	Breite M \pm m in μ	Septen- zahl M	Stamm	Länge M \pm m in μ	Breite M \pm m in μ	Septen- zahl M
6	$24,17 \pm 0,14$	$9,6 \pm 0,01$	3—4	33	$32,4 \pm 0,19$	$9,1 \pm 0,008$	4
42	$24,6 \pm 0,28$	$7,0 \pm 0,009$	2 < 3	48	$33,2 \pm 0,22$	$8,0 \pm 0,01$	3 > 4
31	$24,8 \pm 0,12$	$8,0 \pm 0,003$	2 < 3	101	$33,4 \pm 0,17$	$8,0 \pm 0,005$	3 < 4
71	$25,05 \pm 0,2$	$6,9 \pm 0,008$	2 < 3	26	$33,9 \pm 0,15$	$9,0 \pm 0,004$	3 < 4
8	$25,05 \pm 0,17$	$7,3 \pm 0,007$	2 > 3	86	$34,7 \pm 0,22$	$10,0 \pm 0,007$	4 > 5
72	$26,7 \pm 0,26$	$8,7 \pm 0,005$	2 < 3	5	$35,3 \pm 0,17$	$8,5 \pm 0,006$	3 < 4
64	$26,7 \pm 0,09$	$7,5 \pm 0,01$	2 < 3	50	$35,5 \pm 0,11$	$8,7 \pm 0,01$	4 > 5
22	$27,0 \pm 0,21$	$7,3 \pm 0,004$	3 < 4	77	$36,4 \pm 0,21$	$8,1 \pm 0,005$	3 < 4
55	$27,0 \pm 0,28$	$7,3 \pm 0,006$	3—4	84	$37,5 \pm 0,24$	$8,9 \pm 0,003$	4 > 5
113	$27,1 \pm 0,19$	$8,3 \pm 0,009$	2 < 3	89	$37,8 \pm 0,27$	$8,9 \pm 0,008$	4—5
91	$27,2 \pm 0,23$	$6,9 \pm 0,01$	3 > 4	68	$38,5 \pm 0,19$	$8,3 \pm 0,01$	4 > 5
82	$27,3 \pm 0,16$	$8,1 \pm 0,005$	3 > 4	29	$38,8 \pm 0,11$	$9,6 \pm 0,009$	4 < 5
54	$27,5 \pm 0,31$	$7,5 \pm 0,008$	3 > 4	57	$38,9 \pm 0,14$	$8,8 \pm 0,01$	4—5
15	$27,65 \pm 0,27$	$8,4 \pm 0,007$	3 < 4	7	$39,3 \pm 0,15$	$8,8 \pm 0,01$	4 < 5
60	$27,7 \pm 0,16$	$8,6 \pm 0,007$	3 < 4	41	$41,4 \pm 0,26$	$8,2 \pm 0,008$	5
3	$27,85 \pm 0,12$	$7,9 \pm 0,01$	3—4	25	$41,9 \pm 0,28$	$8,5 \pm 0,007$	4 > 5
9	$27,95 \pm 0,2$	$7,8 \pm 0,01$	3 > 4	69	$42,0 \pm 0,23$	$8,4 \pm 0,006$	4 > 5
51	$28,5 \pm 0,17$	$8,1 \pm 0,009$	3 < 4	13	$42,3 \pm 0,14$	$8,4 \pm 0,01$	4 < 5
75	$28,65 \pm 0,22$	$8,3 \pm 0,006$	3 > 4	30	$43,4 \pm 0,1$	$9,4 \pm 0,003$	5 > 6
36	$28,7 \pm 0,15$	$8,0 \pm 0,003$	3 > 4	46	$43,5 \pm 0,24$	$8,5 \pm 0,009$	5 > 6
19	$28,8 \pm 0,12$	$8,5 \pm 0,004$	3—4	92	$44,7 \pm 0,23$	$9,1 \pm 0,009$	4 < 5
59	$28,95 \pm 0,22$	$7,7 \pm 0,01$	3—4	43	$45,8 \pm 0,28$	$10,02 \pm 0,01$	6
27	$29,3 \pm 0,21$	$9,2 \pm 0,009$	3	2	$46,2 \pm 0,19$	$8,6 \pm 0,008$	5—6
20	$29,55 \pm 0,12$	$8,0 \pm 0,007$	3 < 4	108	$46,8 \pm 0,14$	$8,12 \pm 0,003$	5 > 6
24	$29,65 \pm 0,16$	$8,2 \pm 0,005$	3 < 4	17	$47,4 \pm 0,25$	$9,6 \pm 0,01$	5 < 6
58	$30,0 \pm 0,18$	$10,0 \pm 0,004$	3	39	$48,5 \pm 0,17$	$9,0 \pm 0,009$	5 < 6
32	$30,2 \pm 0,13$	$7,6 \pm 0,01$	3 > 4	14	$50,0 \pm 0,19$	$8,0 \pm 0,007$	7 > 8
119	$30,3 \pm 0,22$	$8,9 \pm 0,01$	3—4	56	$52,35 \pm 0,29$	$8,2 \pm 0,006$	6 > 7
85	$30,5 \pm 0,27$	$8,7 \pm 0,008$	3 < 4	61	$53,1 \pm 0,16$	$8,7 \pm 0,009$	6 > 7
94	$31,2 \pm 0,11$	$8,2 \pm 0,007$	3 < 4	28	$53,1 \pm 0,19$	$8,5 \pm 0,005$	5 < 6
103	$31,2 \pm 0,29$	$8,0 \pm 0,009$	3—4	35	$53,2 \pm 0,12$	$7,9 \pm 0,01$	7 > 8
4	$31,25 \pm 0,12$	$7,9 \pm 0,01$	4	52	$53,3 \pm 0,18$	$9,0 \pm 0,01$	6
18	$31,5 \pm 0,28$	$8,0 \pm 0,003$	3 < 4	74	$53,4 \pm 0,24$	$9,2 \pm 0,007$	6 < 7
49	$31,5 \pm 0,17$	$8,6 \pm 0,005$	3 < 4	83	$53,6 \pm 0,21$	$8,2 \pm 0,005$	6 < 7
73	$32,1 \pm 0,26$	$8,4 \pm 0,009$	3 < 4	16	$56,0 \pm 0,18$	$10,0 \pm 0,008$	7 > 8

die individuellen Größen der Rassen in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen schwanken, daß aber immer und unter allen Bedingungen gleichsinnige Differenzen dieses Rassenmerkmals festzustellen sind, wenn die Stämme in gleicher Weise kultiviert werden.

Während die Conidienlängen verschiedener Stämme unterschiedlich variieren, so daß eine gewisse Größe mit einem charakteristischen Schwankungsbereich als Rassencharakter angesprochen werden kann, haben die Conidienbreiten innerhalb der Art nur eine geringe Streuung. Aus der Conidienbreite kann deshalb kein Rassenmerkmal ermittelt

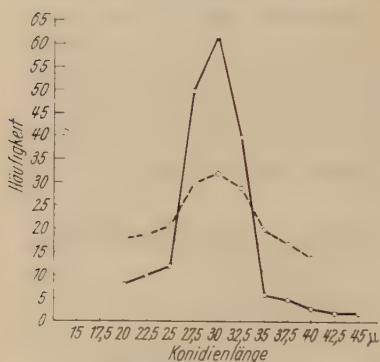


Abb. 1. Die Stämme Nr. 20 und 24 mit gleichen Mittelwerten, aber unterschiedlicher Streuung der Conidienlängen.

— Stamm Nr. 20 M 29,55 \pm 0,12, σ 1,72, N 200. ---- Stamm Nr. 24 M 29,65 \pm 0,16, σ 2,30, N 200

werden, zumindest kann es nicht mit genügender Sicherheit geschehen, wenn man nicht nur Extreme bewerten will, wie z. B. Stamm 71 und Stamm 43 der Tab. 3. Stamm 71 und 43 mit $M_1 = 6,9 \pm 0,008 \mu$ und $M_2 = 10,02 \pm 0,01 \mu$ Conidienbreite können in der Tat als 2 verschiedene Rassen bezeichnet werden. Die Septenzahl scheint mit der Conidienlänge zu steigen. Da aber in allen Größenklassen der Conidienlängen die Septenzahl 4, und teils sehr häufig, vorkommt, kann nicht mit hinreichender Sicherheit von der Septenzahl als von einem parallelen Rassencharakter gesprochen werden. Andererseits kann man auch nicht nach der

Septenzahl eine Rasseneinteilung treffen. Hierfür ist ihre Variabilität im Einhalten von Größenklassen zu unbeständig.

Die Rassenunterschiede der *Helminthosporium*-Stämme äußern sich aber nicht nur in gesicherten Mittelwertsunterschieden. Es gibt auch Rassenunterschiede in der Variationsart, d. h. in der Art, wie die Varianten um den Mittelwert streuen. In Abb. 1 sind 2 Stämme mit gleicher mittlerer Conidienlänge, aber ungleicher Streuung dargestellt. Stamm 20, $\sigma_1 = \pm 1,72$ und Stamm 24, $\sigma_2 = \pm 2,30$. Die Stämme können, weil sie unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden, mathematisch gesichert als 2 verschiedene Rassen angesprochen werden. Tab. 3 zeigte die mittleren Conidienlängen als eine Reihe gleitender Übergänge. Hier in Abb. 1 wird aus diesem Beispiel ersichtlich, daß 2 in der Tabelle mit gleichen Mittelwerten nebeneinander stehende Stämme nicht der gleichen Rasse anzugehören brauchen.

Als ein weiteres Rassenkriterium wurde die Conidienform erkannt. Von der normalen zylindrischen Form kommen einige Abweichungen vor (vgl. Abb. 2—4). Der Stamm aus Cambridge (Nr. 58) zeigte etwas

gekrümmte, keulenförmige Conidien, während einige andere Stämme an den Septen eingeschnürt waren (Nr. 12). Die Art *Helm. papaveris* kann auch auf diese Art und Weise auf Grund der Conidiengestalten in eine Anzahl von Rassen zerlegt werden.

Rassenunterschiede auf künstlichen Nährböden

STAKMAN wies schon 1929 darauf hin, daß die Wuchsbilder pathogener Pilze beim Kultivieren auf Nährböden unterscheidbare Merkmale zeigen, welche verschiedene Rassen erkennen lassen. Bei *Helm. gramineum* haben CHRISTENSEN u.

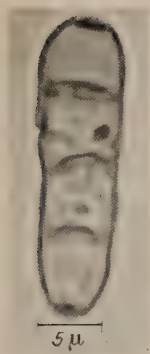


Abb. 2. Stamm 1 mit normalen zylindrischen Conidien



Abb. 3. Stamm 12. An dem abgebrochenen Conidiophor sitzt eine dreizellige Conidie mit eingeschnürten Septen



Abb. 4. Stamm 53. Die Conidien sind etwas gekrümmt und leicht keulenförmig

GRAHAM (1934) viele, durch solche Unterschiede definierbare Rassen beschrieben. BALLARIN berichtete 1950 auch von Unterschieden in *Helm. papaveris*-Kulturen.

Deshalb wurden von uns ausgedehnte Vergleiche von Kulturen auf Nährböden angestellt, um Auskunft über die Variabilität des Pilzes zu erhalten. Dabei wurden von jeder Herkunft Einzelconidien ausgesät, die unter gleichen Bedingungen zu Kolonien herangezogen wurden. Die Parallelen wurden einige Monate danach wiederholt, nachdem der Pilz mehrere Passagen über Malzagar gegangen war. Dabei konnte eine gute Konstanz der Eigenschaften des Pilzes festgestellt werden. Diese Feststellung scheint den Angaben von MEFFERT (1950) zu widersprechen, doch war ihr Material nicht groß genug, und sie spricht selbst von nur geringfügigen Unterschieden, wie z. B. Färbung, die sich zum größten Teil als nicht konstant erwies.

Der Wachstumstyp einiger Rassen war anliegend und unauffällig, bei anderen filzig, wollig oder samtartig. Einige Stämme bildeten überhaupt kein steriles Luftmycel, andere nur im Zentrum der Kolonie eine Flocke oder wieder andere einen festen Klumpen. Auch bildeten verschiedene Formen über die ganze Kolonie verteilt Luftmycelbüschel. Zonierung oder glattes Wachstum zeichnten andere Biotypen aus. Ein Stamm bildete radiäre Luftmycelsträhnen.

Tabelle 4. Zusammenstellung einiger *Helm. papaveris*-Stämme nach den Merkmalen ihrer Wuchsbilder

Stamm	Wuchsbild
26, 38, 49, 71, 76, 98. . .	samtartig glatt, ohne Luftmycel und ohne Zonierung
25, 34, 53, 56, 58, 61, 63, 79, 80, 81, 101, 117 . .	wollig, ohne Luftmycel und ohne Zonierung
47, 64, 75, 86, 103 . . .	wollig, ohne Luftmycel, mit Zonierung
35, 36, 99, 108, 109 . . .	samtartig, lockeres Luftmycel im Zentrum, ohne Zonierung
27, 52, 110	samtartig, filziges Luftmycel im Zentrum, ohne Zonierung
48, 65, 67, 78, 102 . . .	wollig, lockeres Luftmycel im Zentrum, ohne Zonierung
13, 16, 21, 41, 43	wollig, filziges Luftmycel im Zentrum, mit Zonierung
28, 45, 115	samtartig, sehr viel filziges Luftmycel im Zentrum, ohne Zonierung
18, 20, 44, 62, 96, 113 . .	wollig, viel seidiges Luftmycel im Zentrum, ohne Zonierung
11	filzig, radiäre Strähnen
91	seidig, anliegendes Mycel
92, 94, 90	wolliges Luftmycel über der ganzen Kolonie
84	Luftmycelbüschel auf der ganzen Kolonie verteilt
2, 8, 12, 22, 30, 31, 51, 68, 69, 112, 114, 116, 118 .	filziges Luftmycel über der ganzen Kolonie

Tab. 4 faßt die Merkmale der Rassen übersichtlich zusammen. Die Versuche zeigen deutlich, daß *Helm. papaveris* in eine größere Anzahl von Rassen zerfällt, die sich in ihrem Wachstumsbild unterscheiden. Eine Säureschädigung, wie sie DELITSCH (1944) bei verschiedenen *Penicillien* feststellte, liegt hier nicht vor, da *Helm. papaveris* während des Wachstums auf einem neutralen oder schwach sauren Nährmedium die Wasserstoffkonzentration nicht oder nur kaum ändert und, wenn die pH geändert wird, dann nach dem alkalischen Bereich (TRÖGER 1954).

Wachstumsgeschwindigkeit

Bei den Versuchen zum Wachstumstyp fielen einige Herkünfte durch ihr besonders schnelles Wachstum immer wieder auf. Deshalb wurde ein Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten mit 4 Parallelen auf Malzagar angestellt. Dabei konnte die Angabe von BALLARIV (1950), daß die

Anzahl der ausgesäten Conidien, wenn sie gering ist, ohne Bedeutung für die Wachstumsgeschwindigkeit ist, bestätigt werden. Es traten kaum Unterschiede im Wachstum der Kolonien eines Stammes bei Schwankungen einer geringen Conidienmenge auf. Die Durchmesser der Kolonien wurden am Ende des 8. Tages gemessen. Tab. 5 faßt 20 hervorstechende Rassen zusammen, die sich durch ihre Wachstumsgeschwindigkeit eindeutig unterscheiden.

Tabelle 5. *Wachstumsgeschwindigkeit von 20 Helminthosporium papaveris-Stämmen*

Stamm	Durchmesser der Kolonie am 8. Tage mm	Stamm	Durchmesser der Kolonie am 8. Tage mm	Stamm	Durchmesser der Kolonie am 8. Tage mm
68	77 ± 1,01	43	60 ± 1,02	80	47 ± 0,88
32	75 ± 0,89	98	60 ± 1,07	95	45 ± 1,00
33	70 ± 1,11	71	55 ± 0,87	79	42 ± 0,99
72	68 ± 0,68	64	53 ± 0,93	103	40 ± 0,95
29	67 ± 1,05	56	50 ± 0,78	22	35 ± 1,04
63	66 ± 1,10	102	50 ± 1,01	31	33 ± 0,94
58	65 ± 0,99				

Der Einfluß des Lichtes

Bei einigen Stämmen fiel eine starke Zonierung auf, die in der Anzahl genau dem Alter der Kolonie an Tagen entsprach. Wurde der Pilz teils in völliger Dunkelheit, teils normal im Tag-Nachtrhythmus herangezogen, dann zeigten die dem Lichte ausgesetzten Kolonien die normale Zonierung, während die in völliger Dunkelheit gewachsenen Stämme sich mit glatter Kolonie entwickelten. Bei weiterem Wachstum, jetzt im Licht, begann auch hier in den Zuwachsgebieten die tägliche Zonierung. Diese Tatsache muß bei der Rassendiagnose nach dem Wachstumstyp berücksichtigt werden.

Pigmentation

Wie bereits MEFFERT (1950) berichtet, ist der Farbton der Kulturen kaum zur Rassendiagnose zu gebrauchen. Die Qualität einer Pigmentation ist in einer Kolonie sehr vom Nährboden und Alter abhängig. So ist die Grundfarbe auf Malzagar graugrün, auf Czapek Dox-Agar braun, auf Kartoffelagar oliv und auf Mohnsamendekoktagar blaugrün. Mit zunehmendem Alter verdunkeln sich die Farben immer stärker und gehen in völliges Schwarz über, das Luftmycel fällt zusammen und bedeckt als schmutziggrauer Filz das schwarze Conidienpolster.

Viel wichtiger und von praktischem Interesse ist die Farbintensität, also die Quantität der Pigmentproduktion. Wie GRÜMMER (1951) feststellte, hängt das wirksame Toxin von *Helm. papaveris* mit dem Farbstoff zusammen. Es können also Rückschlüsse von der Pigmentproduktion auf die Virulenz des Erregerstammes gezogen werden.

Da die Löslichkeit des Toxins bzw. Farbstoffes in Wasser gering ist, würde eine Beurteilung der in einem Kulturfiltrat nachgewiesenen Menge nur einen kleinen Teil des tatsächlichen Wertes erfassen. Im Mycel dagegen ist die rund 10fache Menge an Pigment zu finden. Der von GRÜMMER (1953) vorgeschlagene Mohnwurzelttest zur Bestimmung der Wirksamkeit des *Helminthosporium*-Toxins war also für diese Untersuchungen ungeeignet, da er nur die an das Substrat abgegebene Menge

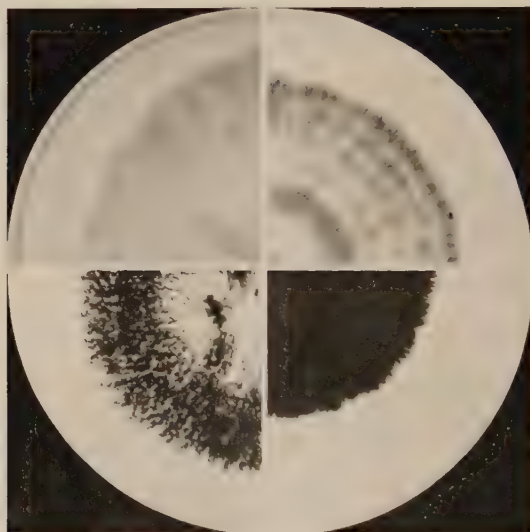


Abb. 5. Vier Rassen des *Helm. papaveris*, welche sich durch die Intensität der Färbung unterscheiden. Von links oben nach rechts unten: Stamm Nr. 51 keine, Nr. 88 geringe, Nr. 47 mittlere, Nr. 34 starke

erfaßt und keinerlei Aussagen zuläßt, ob der gefundene Wert die produzierte Toxinnmenge oder nur das Löslichkeitsprodukt desselben angibt. Es müssen also beide Komponenten, die ins Substrat abgegebene Menge und die im Mycel gespeicherte Menge beurteilt werden. Zu diesem Zwecke eignen sich sehr gut Kulturen, die auf einer dünnen Agarschicht in Petri-Schalen gewachsen sind. Die Beurteilung erfolgt von unten bei durchfallendem Licht. Abb. 5 zeigt je einen typischen Vertreter der Klassen. In Tab. 6 sind 61 Stämme von *Helminthosporium papaveris* nach ihrem Pigmentbildungsvermögen in 4 Klassen eingeordnet. Die stark pigmentierten sind häufiger als die schwach pigmentierten vertreten.

Variationen in der Kultur

Von *Helm. papaveris* sind bis heute noch keine Angaben über Sektorenbildung oder Mutationen bekannt. Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, gibt es eine unbestimmte Anzahl von Rassen, welche weit ver-

breitet sind. Diese Rassen müssen also entweder durch Kreuzung, Heterokaryosis oder Mutationen entstehen.

Tabelle 6. Intensität der Pigmentproduktion einiger *Helminthosporium papaveris*-Stämme

Pigmentbildung	Nr. der Isolierungen
keine	12, 14, 46, 51, 91.
geringe	15, 29, 33, 50, 88, 112, 116, 118, 119.
mittlere	2, 16, 22, 30, 31, 32, 40, 42, 47, 52, 56, 63, 64, 68, 69, 81, 90, 94, 96, 113, 114, 115.
starke	10, 13, 17, 25, 27, 29-a, 32-a, 33-a, 34, 41, 43, 48, 53, 58, 61, 65, 71, 72, 74, 76, 92, 95, 101, 106, 117.

Bei anderen *Helminthosporium*-Arten wurden Sektoren und Fleckenvarianten beobachtet. CHRISTENSEN u. GRAHAM (1934) berichten solche Fälle bei *Helm. gramineum* und DICKINSON (1932) bei *Helm. pedicellatum* und anderen Arten. Bei allen Vergleichen mit anderen *Helminthosporium*-Arten wurden nur solche der Untergattung *Cylindrohelminthosporium* herangezogen, da die Untergattung *Euhelminthosporium*, z. B. *Helm. sativum*, durch die andere Hauptfruchtform (*Ophiobolus*, *Cochliobolus*) einem völlig anderen Formenkreis angehören und mit ersteren nur den Namen gemeinsam haben.

Wie bei *Helm. gramineum* kommen auch bei *Helm. papaveris* nur selten in der Kultur Sektoren vor. Sie wurden bei Einsporkulturen weniger Stämme beobachtet (Abb. 6). Die Sektoren waren durch die Färbung und

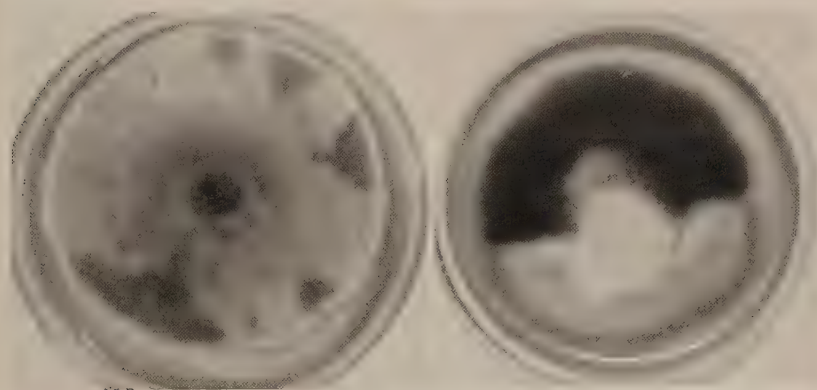


Abb. 6. Sektoren bei *Helm. papaveris* (Stamm Nr. 29 und 119)

Luftmycelbildung von ihren Eltern verschieden. Eine Anzahl dieser Sektoren wurde isoliert und mit ihren Eltern verglichen. Ein Teil der Varianten blieb bei der Weiterkultur durch eine Anzahl von Passagen konstant, während andere sofort wieder neue Sektoren gaben. DICKINSON (1932) fand bei seinen Studien über die Natur der Saltationen bei *Helminthosporium*-Arten, daß die Conidie von einem einzigen Kern

abstammt. Deshalb hält er es für unwahrscheinlich, daß Heterokaryosis die Ursache der Variationen ist, auch wenn die Conidien mit mehreren Keimschläuchen keimen.

Peritheciebildung

Im Herbst bildet *Helm. papaveris* an Mohnstoppeln Perithecieen, die als kleine schwarze Punkte sichtbar sind. Diese Hauptfruchtform ist schon lange bekannt und unter den verschiedensten Namen beschrieben. MEFFERT (1950) diskutiert alle Synonyme und kommt zu dem Schluß, daß dem Erreger der parasitären Blattdürre des Mohns der Name *Pleospora papaveracea* (de Not.) Sacc. zukommt.

Bis jetzt waren noch keine Fruchtkörper in der Kultur beobachtet worden; es gelang nun mit folgender Methodik, reife Perithecieen in der Reinzucht und aus den gebildeten Ascosporen das Conidienstadium wieder zu erhalten.

Zu Herbstanfang werden in Reagensgläser gesunde Mohnstengel eingebracht und so viel Wasser eingefüllt, daß die Stengel zu einem Drittel eintauchen. Nach Sterilisation und Beimpfen mit Conidienmaterial wird der Wattestopfen mit Paraffin abgedichtet und das Röhrchen in einem frostfreien ungeheizten Raum aufgestellt.

Zuerst tritt eine normale Hyphenentwicklung und Conidienbildung ein. Im Winter fällt das Mycel zusammen, und es bilden sich Sklerotien aus, die zu einem Pseudothecium heranwachsen. Im Innern dieses Pseudotheciums werden die Asci gebildet, die je 8 Ascosporen enthalten, welche länglich eiförmig sind. Sie besitzen 3 Querwände und in den mittleren Zellen eine Längswand. Im Frühjahr sind die Ascosporen ausgereift und keimen, auf Malzagar übertragen, zu der Conidienfruchtform aus.

Bei dem Durchlaufen der Sexualphase können sich die Rasseigenschaften ändern. Die Rasse 14 zeichnet sich durch ein seidiges weißes Luftmycel aus, verliert diese Eigenschaft jedoch, nachdem sie aus einer Ascospore zurückgewonnen wurde und zeigt jetzt ein samtig-wolliges Mycel. Rasse 15 verliert ihr filziges Luftmycel und wächst samtig weiter. Diese beiden Beispiele und die des vorigen Abschnittes lassen die große Zahl von *Helm. papaveris*-Biotypen in der Natur verständlich werden.

Zusammenfassung

Annähernd 170 Einsporisierungen von *Helminthosporium papaveris* wurden aus Samen und Pflanzenteilen kranker *Papaver*-Arten hergestellt.

Der Pilz wurde hauptsächlich zwischen der Quer- und Netzzellenschicht der Samenschale der Mohnsamen nachgewiesen.

Die isolierten Stämme wurden auf das Vorkommen morphologisch differenter Rassen untersucht. Die Ergebnisse zeigen an, daß *Helm. papaveris* eine unbestimmte Anzahl von Rassen umfaßt, die sich in

morphologischen Merkmalen deutlich und konsequent voneinander unterscheiden.

Es wurden die Rassen in der Kultur durch folgende Eigenschaften unterschieden: Beschaffenheit und Menge des Mycelwachstums, Zonierung, Bildung von Pigment, Neigung zu Sektoren- und Fleckenvariationen.

Die Morphologie der Conidien ist eine weitere Hilfe bei der Unterscheidung von *Helm. papaveris*-Rassen. Es bestehen statistisch gesicherte Unterschiede in den Längenausmaßen der Conidien.

Die Art des Mediums hat großen Einfluß auf das Manifestwerden der Merkmale einzelner Rassen von *Helm. papaveris*. Ein Vergleich kann nur unter Einhaltung möglichst gleicher Versuchsbedingungen stattfinden.

Die Zonierung der Kulturen ist bei zonenbildenden Stämmen (nicht alle Stämme sind zoniert) vom Tag-Nacht-Rhythmus abhängig.

Viele Rassen von *Helm. papaveris* sind stabil, einige sehr unstabil, d. h. sie spalten in Sektoren oder Fleckvarianten auf. Einige dieser Varianten bleiben durch mehrere Passagen hindurch stabil, andere spalten weiter auf.

Es ist gelungen, die Hauptfruchtform in künstlicher Kultur zu erlangen und reife Ascosporen zu erzielen.

Dabei wurde die Bildung oder Absonderung neuer Rassen in Kulturen beobachtet, welche aus Ascosporen stammen. Man kann daraus folgern, daß ständig durch Bastardierungen und Bastardspaltungen neue Rassen entstehen, die mindestens taxonomisch zu unterscheiden sind. Ob sie auch in ihren pathogenen Wirkungen zu unterscheiden sind, kann aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit noch nicht gesagt werden.

Herrn Prof. Dr. WARTENBERG, Jena, danke ich für die Anregung des Themas und für die Unterstützung während der Arbeit. (Arbeit und Manuskript wurden im Herbst 1953 abgeschlossen.)

Literatur

BALLARIN, C.: Untersuchungen über *Helminthosporium papaveris*. Phytopathol. Z. **16**, 339 (1950). — BARBACKA, K.¹: *Helminthosporium na maku uprawyn* (*Helminthosporium papaveris*, K. SAWADA). Mém. Inst. nat. Polon écon. rur. Pulawy **16**, (1), 73 (1935). — BELL, F. H.¹: Distribution of hyphae of several plant pathogenic fungi in leaf tissue. Phytopathology **41**, 3 (1951).

CHRISTENSEN, J. J.: Studies on the parasitism of *Helminthosporium sativum*. Univ. Minn. agr. exp. stat. techn. Bull. **11** (1922). — CHRISTENSEN, J. J., and T. W. GRAHAM: Physiologic specialisation and variation in *Helminthosporium gramineum*. Univ. Minn. agr. exp. stat. techn. Bull. **95** (1934). — CHRISTOFF, A.: The pleospora disease of cultivated poppy. Min. agric. nat. Domains, Sofia 1930. — CHRISTOFF, A.¹: Pilze, welche die Befleckung der Mohnkapseln und Verschimmelung des Samens verursachen. Z. landw. Versuchsst. in Bulgarien **13**, 13 (1943). — Die Pleosporose, eine Krankheit am Opiummohn. Flugblatt Nr. 53 des Inst. f. Pflanzenschutz, Sofia 1946.

DELITSCH, H.: Über den Einfluß des Nährbodens auf das Wachstum und Farbstoffbildung von Schimmelpilzen. Zbl. Bakter. II Abt. **106**, 357 (1944). — DICKINSON, S.: Nature of saltation in *Fusarium* and *Helminthosporium*. Univ. Minn. agr.

exp. stat. techn. Bull. 88 (1932). — DRECHSLER, C.¹: Some graminicolous species of *Helminthosporium*. J. agr. res. **24**, 641 (1923).

GIRZITSKA, Z. K.¹: Conidien von *Pleospora papaveracea* Sacc. Pan-Soviet Congress Bot. Leningrad S 172 (1928). — GREANEY, F. J., and D. L. BAILEY¹: Studies in cereal diseases. II Root-rots and foot-rots of wheat in Manitoba. Dominion of Canada dept. agr. Bull. **85**, 5 (1927). — GRÜMMER, G.: Beiträge zur Eigenschaftsanalyse der Anfälligkeit von *Papaver somniferum* gegen *Helminthosporium papaveris*. 1. Mitteilung Züchter **21**, 306 (1951). — 2. Mitteilung Nachrichtenbl. dtsh. Pflanzenschutzdienst n. F. **6**, 32 (1952). — 3. Mitteilung Züchter **22**, 366 (1952).

HENRY, A. W.¹: Rootrots of wheat. Univ. Minn. agr. exp. stat. techn. Bull. **22** (1924).

MEFFERT, M. E.: Zur Geschichte der *Helminthosporiose* des Ölmohns. Nachrbl. dtsh. Pflanzenschutzdienst N. F. **3**, 104 (1949). — Ein Beitrag zur Biologie und Morphologie der Erreger der parasitären Blattdürre des Mohns. Z. Parasitenkde **14**, 442 (1950). — MITRA, M.¹: A comparative study of species and strains of *Helminthosporium* on certain Indian cultivated crops. Trans. Brit. Mycol. Soc. **15**, 254 (1931).

NISIKADO, Y.: Bestimmungsschlüssel der *Helminthosporium*-Arten in Sorauer Handbuch der Pflanzenkrankheiten Bd. III, Berlin 1932.

RAVN, F. K.: Nogle *Helminthosporium*-Arten of de af dem fremdkaldte Sygdom hos Byg og Havre. Botanisk Tidskrift **23**, 101 (1900). — ROBERT, A. L.¹: Cultural and pathogenic variability in single-conidial and hyphal-tip isolates of *Helminthosporium turcicum*. U.S. Dept. Agr. Techn. Bull. **1058** (1952).

SAWADA, K.: Tauvan ni okeru Keshi Byogai Chosa. Agr. Exp. Stat. Gov'on Formosa, Bull. **128**, 20—22 (1918). — SCHWEIZER, G.: Zur Anatomie des Mohnsamens. Ber. dtsh. bot. Ges. **49**, 414 (1931). — STAKMAN, E. C.¹: Physiologic specialisation in pathogenic fungi. Proc. Intern. Congr. Plant Science **2**, 1312 (1929).

TRÖGER, R.: Schwermetallwirkungen auf *Helminthosporium papaveris* Saw. Diplomarbeit Univ. Jena (1954).

ULLSTRUP, A. J.¹: Variations within species of *Helminthosporium*. Plant Dis. Rep. Suppl. **22S**, 116—117 (1954).

¹ Diese Arbeiten lagen nur im Referat vor.

(Aus dem Institut für allgemeine Botanik der Friedrich-Schiller-Universität, Jena)

Über das Verhalten verschiedener morphologischer Rassen von *Helminthosporium papaveris* Saw. gegenüber unterschiedlich aktiven Strahlenpilzstämmen

Von
KLAUS NAUMANN

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. August 1957)

Helminthosporium papaveris Saw., der Erreger der Blattdürre des Ölmohns (REINMUTH 1942), läßt sich nicht reisolieren, wenn man ihn einem natürlich belebten Boden zugesetzt hat. Dagegen ist es möglich, ihn auf steriler Acker-, Garten- oder Komposterde zu kultivieren; in diesem Falle gelingt die Reisolierung leicht (GRÜMMER 1950, LANGE 1953). Wie sich auch bei Untersuchungen an anderen Objekten zeigte, kommen als Ursache für die antibiotische Wirkung des belebten Bodens hemmstoffbildende Actinomyceten und Bakterien in Frage (TAUBENECK 1954, DÖLLE 1954 a, b, ETTIG 1955 a).

In den genannten Fällen war mit den üblichen Testmethoden gearbeitet worden. Es ist aber nicht möglich, von diesen Ergebnissen mit Sicherheit auf die Vorgänge im natürlich belebten Boden zu schließen (GÄUMANN 1951, WALLHÄUSER 1951 b, LANGE 1953, SKOLAUDE u. WARTENBERG 1956), zumal es noch vielfach ungewiß ist, ob Antibiotica im Boden bald zerstört werden oder längere Zeit haltbar sind (KÖHLER 1950, 1953, GROSSBARD 1952, REHM 1953/54, NISSEN 1953, STALLINGS 1954, KRASSILNIKOW 1954, WOOD u. TWEIT 1955, STEVENSON 1956). Weil sich jedoch bezüglich *Helm. papaveris* die Ergebnisse der Versuche im Boden und in vitro nicht widersprechen, scheint es gerechtfertigt, weiteren Problemen der Antibiose unter den gut kontrollierbaren Bedingungen des Testversuchs nachzugehen.

MEFFERT (1950) fand, daß *Helm. pap.* keine einheitliche Art darstellt, sondern mindestens in zwei morphologischen Rassen existiert. SCHMIEDEKNECHT (1958) konnte das bestätigen und stellte bei der Untersuchung von etwa 170 Einsporisolierungen dieses Pilzes aus verschiedenen Teilen Deutschlands und des benachbarten Auslandes eine größere Anzahl von Stämmen fest, die sich in Conidiengröße, Luftmycel- und Sporenbildung, Pigmentierung, Wachstumsgeschwindigkeit, Zonierung u. ä. unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit sollte ermittelt werden, inwieweit sich die von SCHMIEDEKNECHT gefundenen morphologischen Rassen von *Helm. pap.* auch physiologisch unterscheiden. Zu diesem Zweck wurde eine wichtige Eigenschaft, nämlich die Empfindlichkeit gegen anti-biotische Actinomyceten, herausgegriffen.

Tabelle 1. Zusammenstellung der diagnostisch wichtigsten Eigenschaften der 8 hauptsächlich verwendeten *Streptomyceten*

Stamm Nr.	5	8	44	60	8 g	37 g	11	46
Conidiophoren ¹	weitspiralig	langgestreckt	langgestreckt	langgestreckt	langgestr.	eng-spiral.		
Sporenform ¹	oval bis rund	oval bis rund	oval bis rund	oval bis rund	oval bis rund			
Farbe d. veg. Mycels ¹	braun	farblos	farblos	farblos	farblos bis gelb	farblos		
Farbe des Luftmycels ¹	grauweiß	grau	graugelb-grünlich	grau	weiß-grau			
Section nach BALDACCI	<i>Series scabies</i>	<i>Series diastaticus</i>	?	<i>Series aureus</i>	<i>Series diastat.</i>			
Pigment auf Glyc.-Glykok.	braun	—	—	—	—	—		
Amylasebildung	++	++	+	+	+	+++		
Peptonisation von Casein	—	—	+	++	+++	—		
Pigment auf Casein	braun	braun	—	—	—	—		
Pigment auf Pepton	braun	braun	—	—	—	—		
Pigment auf Kartoffel	dunkelbraun	braun-schw.	schw.-braun	—	gelb-gefärbt. Mycel	—		
Cellulasebildung	—	—	—	—	++	—		
Gelatineverflüss.	++	++	++	++	++	++		

¹ Bezieht sich auf Nährboden 2 (nach DÖLLE).

² Die Anzahl der + gibt in allen Tabellen die Stärke der jeweiligen Wirkung an. (+) = geringe Wirkung. schw. = schwarz.

A. Material

1. Die Teststämme

Es standen 98 von SCHMIEDEKNECHT (1958) isolierte, morphologisch \pm verschiedene Einsporisierungen von *Helm. pap.* und 7 von SCHLIWA (1955) gewonnene Neuisolierungen zur Verfügung. Stamm HD, mit dem DÖLLE (1954a, b) gearbeitet hatte, diente als ständig mitgetesteter Kontrollstamm. Seine meist dreifach septierten Conidien hatten bei Kultivierung auf Malzagar folgende Größe:

Länge: $23,83 \pm 0,517 \mu$; Breite: $6,84 \pm 0,191 \mu$. Zum Vergleich wurden ein von einem Gerstenfuß isoliertes *Helm. sativum* P., K. u. B. und eine Einsporisolierung von *Colletotrichum atramentarium* (B. et Br.) Taub. (*Coll. atr.*) benutzt, die WAGNER (1955) als Kontrolle verwendet hatte.

2. Die Antibionten

Von 86 durch DÖLLE aus einem Mohnfeld isolierten Actinomyceten wurden 6 Antibionten ausgewählt, die in einem Vortest *Helm. pap.* stark (*A 11*, *A 46*), mäßig (*A 44*, *A 60*) oder schwach bzw. gar nicht (*A 5*, *A 8*) gehemmt hatten und außerdem gute Sporulation zeigten; einige (*A 5*, *A 60*, *A 11*) hatten ihre Aktivität im Vergleich zum letzten Test DÖLLES (1954a) verändert. Später kamen noch 2 von GEMEINHARDT (1954) gewonnene Stämme hinzu (*A 8 g*, *A 37 g*). Die Reinzucht der Strahlenpilzstämme war nach der Kochschen Verdünnungsmethode vorgenommen worden (DÖLLE 1954a, GEMEINHARDT). Als sich bei einzelnen Stämmen Varianten zeigten, wurde dieses Verfahren wiederholt. Ihre wichtigsten morphologischen und physiologischen Eigenschaften sind in Tab. 1 aufgeführt. Die Stämme *A 5* und *A 8* konnten nach KRASSILNIKOW (1949)¹ und WAKSMAN (1948) als *Streptomyces phaeochromogenus* (Conn) Waksman bestimmt werden; die Artzugehörigkeit der anderen ist nicht sicher.

Jeder der 6 aktiven Stämme rief im Strichtest einen charakteristischen Hemmhof hervor, ähnlich wie es von WALLHÄUSER (1951), OPPERMANN (1951), MAGDON (1955) und WAGNER (1955) bei Anwendung von Antagonisten und von KNÖLL (1946) beim Antibioticatest beschrieben wurde. Meist traten folgende Typen (in Anlehnung an MAGDON) auf: Typ I: Diffuse (spärlich bewachsene) Hemmzone. Typ II: Totale Hemmzone. Typ III: Außerhalb der totalen Hemmzone ist noch ein diffuser Hemmbereich vorhanden. Typ IV: Außerhalb der totalen Hemmzone liegt ein (meist schmaler) Förderwall.

Die untersuchten Stämme bildeten bei 3 Tagen Vorlaufzeit und 7 Tagen gemeinsamer Bebrütung mit den Testpilzen Hemmzonentypen, die sich je nach Teststamm, Besprühdichte, Nährbodenzusammensetzung und Ablesetermin ändern konnten (Tab. 2).

Tabelle 2. Die von den einzelnen *Streptomyceten*stämmen hervorgerufenen Hemmzonentypen

Stamm Nr.	<i>A 5</i>	<i>A 44</i>	<i>A 8</i>	<i>A 46</i>	<i>A 11</i>	<i>A 60</i>	<i>A 8 g</i>	<i>A 37 g</i>
Hemmzonentypen								
normal	—	III	—	II	II	II	II	II
Ausnahmen	I	—	I	IV	III	III	IV	IV

Die Leistungsfähigkeit verschiedener Stämme ging — wohl infolge der ständigen Kultivierung auf demselben Nährboden (Nr. 2) — allmählich zurück (SCHATZ u. WAKSMAN 1945, WAKSMAN u. SCHATZ 1945, JONES 1946, WAKSMAN 1950, PFENNIG 1952, WILLIAMS u. MCCOY 1953, PERLMAN u. a. 1954, WAGNER 1955 und andere; siehe auch ERIKSON

¹ Herr Dr. G. M. HOFFMANN, Aschersleben, überließ mir dankenswerterweise seine noch unveröffentlichte Übersetzung dieses Werkes.

1949). Es traten daneben bei *A 11*, *A 44*, *A 46* und *A 60* Varianten mit veränderter Luftmycelentwicklung oder Sporen- bzw. Luftmycelfarbe auf (vgl. LINDENBEIN 1952). Die Reaktivierung gelang auf v. PLOTHO-Agar, Cellulosestreifen (LINDENBEIN 1952) und besonders gut auf Kartoffelscheiben (RUSCHMANN 1952c, REHM 1953/54). Erdpassagen steigerten — wie bei LINDENBEIN — die Aktivität nicht merklich (außer bei einem Stamm), förderten aber die Sporenbildung (s. a. FROMMER 1956). Im Bedarfsfalle konnte auch auf Sporenkonserven (Erd-Sporenmischung nach PFENNIG 1952) zurückgegriffen werden.

B. Methoden

1. Nährsubstrate¹

Nährboden Nr. 1 (Malzagar nach JANKE 1946): Malzextrakt 4 g; Pepton 0,4 g; Agar 3%; ad 100 ml Aqua dest.; pH 5,5—6. — Nährboden Nr. 2 (nach DÖLLE 1954a): Stärke (löslich) 1 g; Malzextrakt 0,5 g; MgCO_3 0,1 g; NaNO_3 0,1 g; NaCl 0,05 g; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g; Agar 3%; ad 100 ml Aqua dest. — Nährboden Nr. 2a: Stärke 1,0 g; Pepton 0,15 g; sonst wie Nr. 2; pH 8. — Nährboden Nr. 3 (Stärkeagar nach WAKSMAN 1950): Wie Nr. 2, aber ohne Malzzusatz. — Nährboden Nr. 4: Glucose 5 g; Pepton 1 g; Agar 3%; Humusextrakt 300 ml (Aufschlammung 1 Std lang auf 60° C erhitzt und abfiltriert). — Nährboden Nr. 5 (nach v. PLOTHO 1940): Glycerin 2,0 g; Glykokoll 0,25 g; NaCl 0,1 g; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g; CaCO_3 in Spuren; Agar 3%; ad 100 ml Aqua dest.; pH 6,3—6,5. — Nährboden Nr. 5b (nach PFENNIG 1952): Wie Nr. 5, aber mit Zusatz von 0,1 ml Hoagland-Spurenlösung. — Nährboden Nr. 5d (nach PFENNIG 1952): Wie 5, aber mit 0,1 ml Hoagland-Spurenlösung und 0,1 ml Hefewasser (HENNEBERG); pH 6,4. — Nährboden Nr. 6 (Cellul-substr.): MgCO_3 0,1 g; NaNO_3 0,1 g; NaCl 0,05 g; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g; ad 100 ml Aqua dest.; davon 2 ml in ein Reagensglas, in das dann ein Cellulosestreifen eingeführt wird. — Nährboden Nr. 6a (Cellulosemedium nach SCALES 1916): Zuerst gelöste Papiercellulose wird wieder ausgefällt, abfiltriert und mit Leitungswasser aufgenommen; Agar 3%. — Nährboden Nr. 7 (mit GRUBDORFER-Lösung): Glycerin 2 ml; NaNO_3 0,85 g; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,18 g; K_2HPO_4 0,12 g; NaCl 0,2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g; Hoagland-Lösung 0,1 ml; Agar 3%; ad 100 ml Aqua dest. — Nährboden Nr. 8 (nach LINDENBEIN 1952): Glycerin 2 ml; NaNO_3 0,85 g; NaCl 0,1 g; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g; CaCO_3 0,001 g; Hoagland-Lösung 0,1 ml; Agar 3%; ad 100 ml Aqua dest. — Nährboden Nr. 9: Kartoffelscheiben. — Nährboden Nr. 10 (Milchagar nach PFENNIG 1952): Magermilch 60%; Wasser 40%; Agar 3%. — Nährboden Nr. 11 (Gelatine-Nährboden): Glucose 0,2 g; Pepton 0,05 g; Gelatine 10—20 g; ad 100 ml Aqua dest.

2. Teste

Größtenteils wurde das Strichtestverfahren nach STESSEL, LEBEN u. KEITT (1953) angewendet, das sich bereits gut bei Antibiosetesten mit *Helm. pap.* bewährt hatte (TAUBENECK 1954, DÖLLE 1954a, ETTIG 1955a). Als Testsubstrat für Pilz und Antagonisten gleichermaßen geeignet war der Nährboden nach DÖLLE. Die mit KOH auf pH 6,8—7,0 eingestellte cH^+ stieg durch das Sterilisieren auf pH 6,5 bis 6,3. Je 10 ml des heißen Nähragars wurden in Petri-Schalen von 8 cm Ø ein-

¹ Der Gehalt an Kristallwasser wurde berücksichtigt.

pipettiert (Schichthöhe etwa 3—3,5 mm¹), die gegossenen Platten dann im Autoklav bei 120° C und 1 atü 20 min sterilisiert (JANKE 1946) und schließlich zum Erkalten auf eine ebene Fläche gestellt. Ihre Beimpfung erfolgte (zwecks Abtrocknung erst am nächsten Tage) so, daß auf jede Platte je 2 unterschiedlich aktive Stämme mittels Platinöse in parallelen Strichen aufgetragen wurden: *A 5/A 44*, *A 8/A 46*, *A 11/A 60*, *A 8 g/A 37 g*. Bis zum Aufsprühen des Testpilzes verblieben die Platten 3 Tage bei 28° C im Thermostaten.

Die *Helm.*-Stämme kamen vor dem Test auf Testagar-Schrägröhrchen, blieben für 7 Tage bei 28° C und danach zur besseren Conidien- und Farbstoffbildung noch 3—4 Tage im Labor stehen. Nach Aufreißen des Mycels und Zugabe von Glasperlen wurde mit physiologischer Kochsalzlösung so lange geschüttelt, bis in der überstehenden Flüssigkeit eine deutliche Trübung durch losgelöste Conidien und Hyphen eintrat. Gut sporulierende Stämme enthielten dann 100 000—200 000 Sporen je Milliliter; höhere Konzentrationen wären wegen der wenig sporulierenden Stämme ungeeignet gewesen. Zum Besprühen der Testplatten, die danach nochmals für eine Woche in den Thermostaten kamen, diente eine einfache Glasapparatur.

Trotz genauer Einhaltung dieser Methode blieben folgende Unsicherheitsfaktoren bestehen: 1. Unbestimmbarkeit der aufeimpften Actinomycetenmenge. 2. Unterschiedliche Sporensuspensionsdichte bei den *Helm.*-Stämmen. 3. Aktivitätsschwankungen der Actinomyceten. 4. Verwendung von Chemikalien unterschiedlichen Reinheitsgrades. Es wurde versucht, diese Fehlerquellen durch Nachprüfen in gesonderten Versuchen, durch ständiges Mitführen eines Kontrollstammes (*HD*), durch Arbeiten mit mindestens 3 oder 4 Parallelen und — wenn nötig — Wiederholungen sowie durch ein geeignetes Auswerteverfahren auszuschalten.

Während man beim Diffusionstest meist die Entfernung Hemmstoffgabeort: Testorganismus in Millimeter als Aktivitätsmaß benutzt, wurde hier die Hemmhofbreite (*H*) zur Koloniebreite (*K*) in Beziehung gesetzt. Die Messung von *H* und *K* erfolgte von der Petri-Schalen-Unterseite her mit dem Lineal (Meßgenauigkeit: für *H* = 1 mm, für *K* = 0,5 mm). Innerhalb der Parallelen wurden, soweit erforderlich, Mittelwert (*M*), Standardabweichung (*σ*), mittlerer Fehler (*m*) und Variationskoeffizient (*v*) errechnet. Zur statistischen Sicherung verschiedener Ergebnisse wurde das *t*-Test-Verfahren nach PÄTAU (1943) angewendet. Gute Sicherung lag vor, wenn *P* < 0,0027.

Einzelne Versuche wurden auch mit dem Strichtest nach FLEMING (1929) ausgeführt.

C. Versuche zur Methodik des Biotypentestes

Da im Lochtest nur einer der Antagonisten Hemmstoffbildung zeigte, kam lediglich der Vitaltest zur Untersuchung von Empfindlichkeitsunterschieden zwischen *Helm. pap.*-Rassen in Betracht. Im folgenden wurde daher geprüft, inwieweit und in welcher Form sich dieser Test im vorliegenden Falle anwenden läßt.

1. Einfluß der Aufimpfungsmenge

Zunächst wurden Sporensuspensionen bekannter Dichte in je 4 Parallelen a) mit der Impföse, b) mit einer zu einer 3 cm langen Kante gebogenen Drahtschlinge und c) mittels 1 mm breiter Papierstreifen aufgetragen. *HD* fungierte als Teststamm. Die Suspensionsdichte lag nach Zählungen mit der Thoma-Kammer zwischen 45 (*A 8*) und 92 Mill.

¹ Da manche Schalen dickere Wände oder einen nicht ganz ebenen Boden hatten, schwankte die Schichthöhe ein wenig.

Sporen/ml (*A 8g*). Die Streuung (σ) zwischen den Parallelen war jedoch bei allen 3 Methoden nicht geringer als bei gleichzeitig durchgeführter normaler Sporenimpfung. Dies ließ sich durch einen Versuch mit den *Helm.*-Stämmen *HD*, *H 106*, *H 113* und *H 115* bestätigen, bei dem die kantig gebogene Schlinge angewendet wurde.

2. Die Vorlaufzeit

Zur Ermittlung der günstigsten Vorlaufzeit wurde jeweils eine Gruppe Platten 3, 8 und 14 Tage vor dem Besprühtermin beimpft. Die Reaktionen der Testpilze *HD*, *H 17* und *H 16* zeigten stets die gleiche

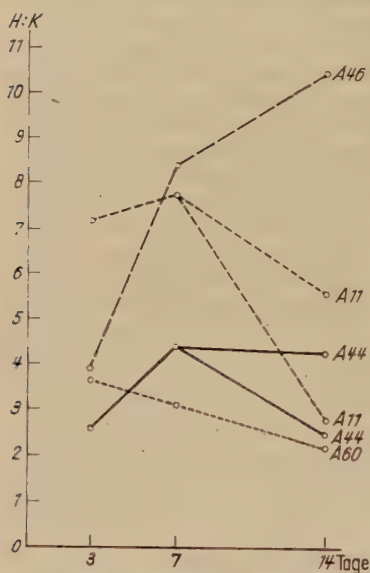


Abb. 1. Veränderung der relativen Hemmhofgröße ($H:K$) von 4 aktiven Actinomycesen mit der Länge der Kultivierung vor dem Aufsprühen des Testpilzes *HD*. Gabelung der Kurven bedeutet Auftreten einer diffusen und totalen Hemmzone. (Es handelt sich stets um Mittelwerte)

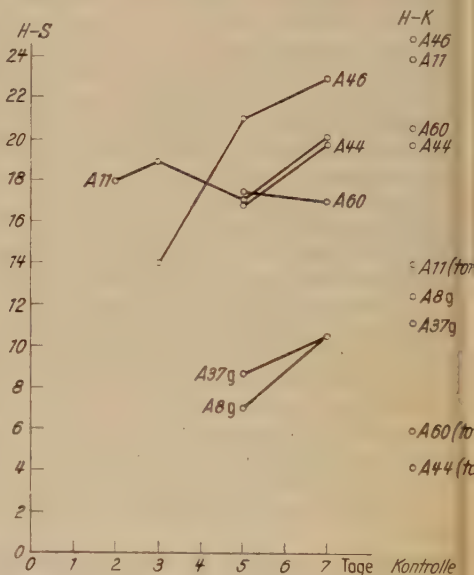


Abb. 2. Zunahmen der Hemmhofgröße (Hemmhofbreite minus Breite des herausgeschnittenen Koloniestreifens = $H-S$) mit der Dauer der Kultivierung des Actinomycesen. Rechts ist die Kontrolle angegeben

Tendenz (Abb. 1). Die totale Hemmzone von *A 44* vergrößerte sich in 6 Tagen, wurde dann aber wieder (z. T. unter Ausbildung einer größeren diffusen Hemmzone) schmaler. Bei dem inaktiven Stamm *A 5* stellte sich — wohl durch Autolyseprodukte oder Nährstoffentzug — bei langer Vorlaufzeit eine diffuse Hemmzone ein. Bei *A 46* war eine ständige Steigerung der Hemmstoffproduktion festzustellen. Für *A 11* und *A 60* ließen sich Wirkungsoptima zwischen dem 3. und 7. Tag nachweisen. Dieser Versuch wurde für *A 46*, aufgeschlüsselt nach Tagen, in 2 Versuchsreihen (Testpilz *HD*) wiederholt (Verbindungslinien in Abb. 4).

Ganz Ähnliches war festzustellen, als täglich bei 12 von 78 Testplatten die aufgeimpften Antagonisten herausgeschnitten wurden; das Aufspritzen der Testpilze erfolgte 3 Tage nach dem Impfen. Die Stämme *A 44*, *A 60*, *A 8 g* und *A 37 g* hemmten die Pilzkultur erst nach 5 Tagen merklich, Stamm *A 46* bereits nach 3 Tagen und *A 11* sogar schon vom 2. Tag an. Diese Wirkung erhöhte sich laufend bei *A 46*, *A 60*, *A 8 g* und *A 37 g* (Abb. 2). In einem anderen Versuch, bei dem die Antagonisten nicht nur 3, 5 bzw. 7 Tage nach dem Beimpfen ausgeschnitten, sondern ebenfalls in Etappen (nach 3, 5 usw. Tagen) besprüht wurden, zeigte sich eine um so geringere Hemmwirkung, je länger die Zeitspanne zwischen Ausschneiden und Besprühtermin war.

3. Der Einfluß der Menge der aufgespritzten Testpilze

KNÖLL (1947) fand, daß bei gleicher Penicillinkonzentration höhere Keimdichten kleinere Hemmhöfe ergaben als geringe. Wegen der unterschiedlichen Sporulationsfähigkeit der Pilzstämmen mußte auch für die vorliegende Untersuchung der Einfluß der Testorganismenkonzentration geklärt werden.

Der Teststamm *HD* wurde in Suspensionsdichten von 110 000 bis 290 000 Sporen je Milliliter und deren Verdünnungen 1 : 1 (etwa 40 000 bis 140 000 Sporen/ml) angewendet, da etwa in diesem Bereich, nach der Trübung zu urteilen, die Sporenkonzentrationen bei Abschwemmung der verschiedenen *Helm. pap.*-Rassen schwankten. Zwischen den gegebenen Suspensionsdichten traten, ebenso wie bei einem zweiten Versuch, keine statistisch gesicherten Differenzen in den von *A 46* hervorgerufenen Hemmhofgrößen auf (Tab. 3).

Tabelle 3. Die Wirkung unterschiedlicher Besprühdichte und Agarschichthöhe auf die Sensibilität von *HD* nach 3 Tagen Vorlaufzeit für *A 46*
(Mittelwerte H : K)

Agarmenge in ml	Größe des relat. Hemmhofes				Sicherung
	hohe Con.-Konz.		geringe Con.-Konz.		
	<i>M</i>	<i>m</i>	<i>M</i>	<i>m</i>	
10	7,7	± 0,2	8,9	± 0,3162	—
15	5,8	± 0,14	5,9	± 0,141	—
20	4,1	± 0,4	4,5	± 0,0	—

4. Die Vorkultur

In einem Versuch mit 7 und 20 Tage alten Strahlenpilzkulturen erwies sich die jüngere als etwas aktiver (Abb. 4). Hemmwirkungsunterschiede zwischen 18 Tage und 6 Wochen alten Vorkulturen traten nur bei *A 46*, wo die jüngeren, und (geringer) bei *A 11*, wo die älteren Kulturen

aktiver waren, auf. Versuche über die Ernährung der Antibionten-Vorkulturen wurden nicht angestellt, da alle Stämme der Gewöhnung wegen zunächst über den Testagar liefen.

Die Sensibilität der Testpilze war unabhängig von Alter und Substrat der Vorkultur.

5. Die Nährbodenwahl

Entscheidender wirkte sich demgegenüber die Zusammensetzung des Testnährbodens auf die Sensibilität des Testpilzes aus (PORTER 1924, EISER u. MCFARLANE 1948, GREEN u. WAKSMAN 1948, DULANEY 1949,

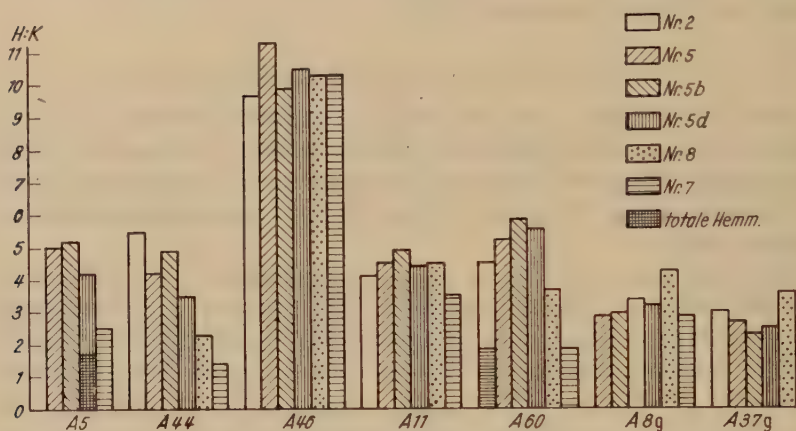


Abb. 3. Größe der relat. Hemmhöfe auf verschiedenen Nährböden (siehe Nährbodenrezepte!). Testpilz *HD*

OPPERMANN 1951, RUSCHMANN 1952 c, d, 1954; siehe auch KÖHLER 1956). Während z. B. *A 11* und *A 44* auf den Nährböden 2 und 3 gleich große Hemmhöfe erzeugten, bildete *A 60* auf Nährboden 3 eine zusätzliche diffuse Hemmzone (Typ III). Die Stämme *A 8 g* und *A 37 g* (z. B. stärkere Wirkung auf Nährb. 8) sowie *A 44* und *A 60* (geringe Entwicklung auf Nährb. 7 und 8) verhielten sich in ihrer Aktivität gegen *HD* auf den verschiedenen Medien untereinander ähnlich (Abb. 3). *A 46* war überall annähernd gleich aktiv. *A 5* zeigte auf einigen Nährböden eine deutliche Hemmwirkung und rief auf Nährb. 7 eine Förderungszone hervor. Die Actinomycceten gediehen, ebenso wie die Testpilze, am besten auf 5 d und dem Testagar (Nr. 2).

6. Der Einfluß der Agarschichthöhe

Um die Wirkung verschiedener Agarschichthöhen (OPPERMANN 1951, HUMPHREY u. LIGHTBOWN 1952) zu untersuchen, wurden in 8 cm-Petri-Schalen 10, 15 und 20 ml (= etwa 3,5; 5,2; 7 mm Höhe) vom Testagar

einpipettiert. 7 (Tab. 3) und 20 Tage alte Kulturen von *A 46* mit je 1—6 Tagen Vorlaufzeit dienten als Antagonisten (Abb. 4). Die auffallend großen Hemmhöfe der 10 ml-Platten sind nicht durch Nährstoffmangel bedingt, da dann nämlich die inaktiven Stämme *A 5* und *A 8* ebenfalls Mangelhöfe hätten zeigen müssen.

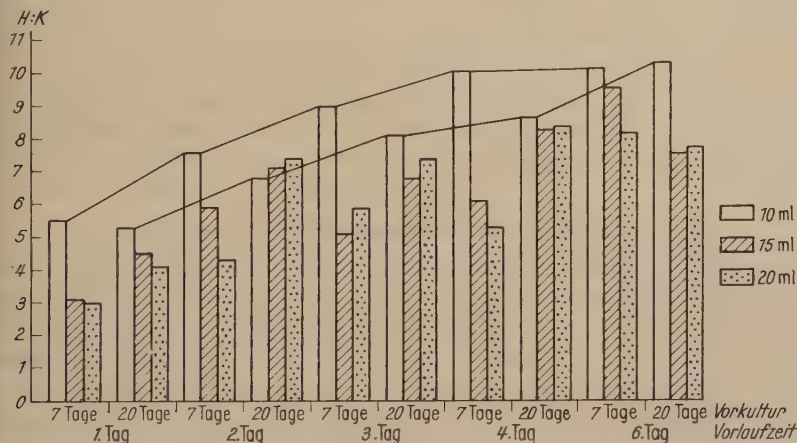


Abb. 4. Wirkung unterschiedlicher Agarschichthöhe (10, 15, 20 ml), verschieden alter Vorkulturen (7 und 20 Tage alt) und verschieden langer Kultivierung der Strahlenpilze vor dem Aufsprühen des Testpilzes *HD*

7. Die cH -Abhängigkeit des Antibiosetestes

Der Einfluß der cH^+ auf die antibiotischen Beziehungen (RUSCHMANN 1952b, d, 1955, STOLL u. a. 1952, DÖLLE 1954b, REHM 1954/55) zeigte sich auch bei *A 46* (Testpilz *HD*), wo der (vor dem Sterilisieren) mit HCl auf pH 5,5 eingestellte Testagar die größten Hemmhöfe erbrachte (Tab. 4).

Tabelle 4. cH^+ -Abhängigkeit der relativen Hemmhofbreite

cH -Wert	pH 5,5	pH 7,1	pH 8,4
M	9,4	8,99	8,23
m	$\pm 0,169$	$\pm 0,656$	$\pm 0,247$

8. Die zeitlichen Veränderungen der Hemmhöfe

Fortwährende Veränderungen der Hemmhöfe (WALLHÄUSER 1951a, REHM 1954/55; s. a. WALLHÄUSER u. RIPPEL-BALDES 1950, WALLHÄUSER 1951c) ließen sich bei Auswertung am 3. und 7. Tage nach dem Aufsprühen von *HD*, *H 79* und *H 80* feststellen (Tab. 5). Meist verkleinerten sich die ursprünglichen Hemmzonen und bei *A 11* verwandelten sich die Hemmhöfe vom Typ II (totale Inhibitionszone) in den Typ III (totaler und äußerer diffuser Hemmbereich). In einem anderen Versuch führten Bonitierungen nach 2, 4 und 7 Tagen zu ähnlichen Ergebnissen.

Tabelle 5. Veränderungen der relativen Hemmhofgrößen (Mittelwerte $H : K$) innerhalb einer Woche. Berücksichtigt wurden nur die totalen Hemmzonen

	A 11			A 44			A 60		
	HD	H 79	H 80	HD	H 79	H 80	HD	H 79	H 80
1. Ablesung	5,1	5,7	6,3	6,4	5,3	5,3	4,9	4,8	4,4
2. Ablesung	2,7	2,9	2,9	2,5	2,3	3,1	1,6	1,9	2,0

	A 46			A 8 g			A 37 g		
	HD	H 79	H 80	HD	H 79	H 80	HD	H 79	H 80
1. Ablesung	8,7	6,4	7,0	3,5	1,8	1,7	2,2	1,8	1,3
2. Ablesung	6,7	6,7	6,7	2,8	2,0	1,4	2,3	1,7	1,3

9. Die Wirkung der Testpilze auf die Streptomyceten

Wie sich bei gleichzeitiger Impfung von Pilzen und Actinomyceten im Strichtest nach FLEMING herausstellte, beeinflusste *Helm. pap.* lediglich das Wachstum von A 44 und A 8 g ein wenig; bei 4 Tagen Vorgabe für den Pilz wurde das Wachstum von A 5, A 44, A 8 und A 60 geringfügig beeinträchtigt. Wurden die *Helm.*-Stämme punktförmig in die Mitte einer Testplatte geimpft und nach 3 Tagen 2 Actinomyceten im Abstand von je 1,5 cm vom Rand der Pilzkolonie strichförmig aufgetragen (ETTIG 1955b), so blieben alle Streptomyceten unbeeinflusst. Bei gleichzeitiger Strich-Punkt-Impfung (3 cm Distanz) wurden nach einiger Zeit A 44, A 60, A 8 g, A 37 g und erstmals auch A 11 von HD in ihrem Breitenwachstum gehemmt.

Bei der im Sprühtest üblichen 3tägigen Vorbebrütung konnte jedoch keinerlei Beeinflussung des Antibionten durch die Testpilze festgestellt werden.

D. Die Biotypenteste

1. Die Abhängigkeit der Hemmhofbreite von der Koloniebreite

Nach Feststellung der besten Testmethoden wurde das Maß „relative Hemmhofgröße“ auf seine Brauchbarkeit untersucht. Da Wachstumsschwankungen der Actinomyceten sich in der Koloniebreite bemerkbar machen mußten, wurden die Hemmhofbreite (H) und die Breite der Antagonistenkolonie (K) zueinander in Beziehung gesetzt. Dafür gab es praktisch 3 Möglichkeiten: a) Berechnung der Differenz $H - K$ („wahrer Hemmhof“); b) Aufstellung des Verhältnisses $H : K$ („relativer Hemmhof“); c) Errechnung des Verhältnisses $\frac{H-K}{K}$ („wahrer Hemmhof“/Koloniebreite).

Das beste Verfahren mußte beim Vergleich die geringste Streuung (σ) bzw. den kleinsten Variationskoeffizienten (v) aufweisen. Daher wurde zunächst bei Stamm

A 44 (Testpilz *HD*) für die Breiten des Hemmhofs und der Kolonie der Korrelationskoeffizient (r) nach der Formel von BRAVAIS

$$r = \frac{\sum p a_x a_y - n b_x b_y}{n \cdot \sigma_x \cdot \sigma_y}$$

und dessen mittlerer Fehler nach PEARSON u. FILON $m_r = \frac{1-r^2}{n}$ errechnet (JOHANNSEN 1926).

Die Berechnung aus 161 Varianten ergab die gute mittlere positive Korrelation (WEBER 1956) $r = +0,5944 \pm 0,051$.

Zwischen „wahrer Breite“ des Hemmhofs ($H - K$) und der Koloniebreite (K) bestand demgegenüber nur die schwache positive Korrelation (162 Varianten) $r = +0,2147 \pm 0,043$.

Für die Breite des Gesamthemmhofs (einschließlich des diffusen Hemmbereichs) und der Kolonie von *A 44* hatte der Korrelationskoeffizient bei 148 Varianten den Wert $r = +0,5428 \pm 0,058$, während die Korrelation ($H - K$) : K für den Gesamthemmhof weniger gut gesichert war (148 Varianten): $r = +0,3446 \pm 0,072$.

Eine gute Korrelation ergab sich also für *A 44* nur zwischen H und K , aber nicht in dem Maße zwischen $H - K$ und K . Da die Stämme *A 11*, *60*, *8 g* und *37 g* sich im Antibiosetest ganz ähnlich verhielten wie *A 44*, mußte nur noch für den hochaktiven, aber schnell degenerierenden Stamm *A 46* der Nachweis einer gegenseitigen Abhängigkeit von H (bzw. $H - K$) und K erbracht werden. Die Korrelation $r = +0,293 \pm 0,064$ von H und K wurde an Hand von 202 Proben bestimmt; sie war zwar schwach, doch immer noch größer als die Korrelation zwischen $H - K$ und K .

Es schien demnach berechtigt zu sein, Hemmzonenbreite H und Koloniebreite K in eine zahlenmäßige Beziehung zu setzen. Durch Variabilitätsvergleiche mußte nun nachgewiesen werden, ob die Errechnung der Differenz $H - K$ oder das Verhältnis $H : K$ für die Biotypenteste geeigneter war.

2. Untersuchung des Kontrollstammes *HD*

Um den Schwankungsbereich beim Biotypentest zu erfassen, wurden alle Aktivitätsmessungen zusammengefaßt, die bisher mit dem Kontrollstamm *HD* an den 6 aktiven Actinomyceeten vorgenommen werden konnten. Bei Stamm *A 44* wurde dabei nicht nur das Verhältnis $H : K$, sondern auch die Differenz $H - K$ und der Quotient $(H - K)/K$ zugrunde gelegt.

Für $H - K$ ergaben sich folgende Werte:

$M = 24,07 \pm 0,437$ mm	$\sigma = \pm 5,313$ mm	$v = 22,08$ (Gesamthemmhof)
$M = 7,6 \pm 0,376$ mm	$\sigma = \pm 4,67$ mm	$v = 66,22$ (totale Hemmzone)

Der für den Vergleich unterschiedlicher Meßreihen wichtige Variabilitätskoeffizient v errechnet sich nach der Formel (JOHANNSEN)

$$v = \frac{100 \cdot \sigma}{M}.$$

Das Verhältnis H : K zeigte folgendes Ergebnis:

$$\begin{array}{lll} M = 4,68 \pm 0,075 & \sigma = \pm 0,9315 & v = 19,9 \text{ (Gesamthemmhof)} \\ M = 2,28 \pm 0,063 & \sigma = \pm 0,808 & v = 35,49 \text{ (totale Hemmzone)} \end{array}$$

Der Quotient (H — K)/K ergab größere Schwankungen:

$$\begin{array}{lll} M = 3,65 \pm 0,074 & \sigma = \pm 0,9 & v = 24,67 \text{ (Gesamthemmhof)} \\ M = 1,46 \pm 0,099 & \sigma = \pm 1,257 & v = 86,05 \text{ (totale Hemmzone)} \end{array}$$

Beim Vergleich der Variationskoeffizienten weist — besonders deutlich für die totale Hemmzone — das Verhältnis H : K die geringsten Schwankungen auf.

Ganz Ähnliches ließ sich auch für Stamm A 46 konstatieren. H — K für alle Teste von HD ergab:

$$M = 23,16 \pm 0,519 \text{ mm} \quad \sigma = \pm 7,54 \quad v = 33,34.$$

Für H : K konnte errechnet werden:

$$M = 8,25 \pm 0,519 \quad \sigma = \pm 2,515 \quad v = 30,47$$

und für (H — K)/K:

$$M = 7,42 \pm 0,18 \quad \sigma = \pm 2,57 \quad v = 34,18$$

Dieser Variabilitätsvergleich berechtigte dazu, die „relative Hemmhofgröße“ H : K als Inhibitionshofmaß zu verwenden, wie es in Tab. 6 für alle 6 aktiven Stämme geschehen ist.

Tabelle 6. Gesamtergebnis aller Teste der 6 aktiven Strahlenpilze gegen HD
(Mittelwerte H : K) G = Gesamthemmhof, t = totale Hemmzone

	A 11		A 46		A 44		A 60		A 8 g	A 37 g
	G	t			G	t	G	t		
M	4,70	3,21	8,25	4,68	2,28	4,17	1,89	2,76	2,85	
± m	0,08	0,07	0,52	0,08	0,06	0,08	0,05	0,06	0,06	
± σ	0,84	0,82	2,52	0,93	0,81	1,00	0,67	0,63	0,67	
v	17,8	25,5	30,5	19,9	35,5	23,9	35,3	22,9	23,5	

3. Sensibilitätsunterschiede zwischen den einzelnen *Helm.-pap.-Rassen*

Es war vorerst nicht nötig, die Empfindlichkeit jedes einzelnen *Helm. pap.*-Stammes mit diesen soeben für HD gefundenen Werten zu vergleichen. Vielmehr wurde zunächst angenommen, daß die *Helm.*-Stämme sich untereinander nicht unterscheiden. Demnach müßten die relativen Hemmhofgrößen aller anderen *Helm. pap.*-Stämme zusammengekommen in Mittelwerten, Standardabweichungen und Variabilitätskoeffizienten genau übereinstimmen mit den Hemmhofwerten aller

Teste, die mit dem Kontrollstamm *HD* durchgeführt wurden. Würden nämlich einzelne *Helm.*-Stämme von dieser *HD*-Norm abweichen, so müßte sich eine größere Streuung als bei *HD* ergeben. Ein Vergleich der Tab. 6 und 7 zeigt jedoch eine weitgehende Übereinstimmung aller untersuchten *Helm. pap.*-Rassen in ihrer Sensibilität.

Tabelle 7. *Ergebnis aller Tests der 6 aktiven Actinomyceten gegen alle Helm. pap.-Rassen (Bezeichnung wie in Tab. 6)*

	<i>A 11</i>		<i>A 46</i>	<i>A 44</i>		<i>A 60</i>		<i>A 8 g</i>	<i>A 37 g</i>
	<i>G</i>	<i>t</i>		<i>G</i>	<i>t</i>	<i>G</i>	<i>t</i>		
<i>M</i>	4,83	3,13	8,16	4,6	2,42	3,99	1,98	2,69	2,96
± <i>m</i>	0,05	0,05	0,13	0,05	0,06	0,07	0,05	0,05	0,51
± <i>σ</i>	0,87	0,68	2,66	1,03	0,8	1,07	0,71	0,74	0,8
<i>v</i>	17,9	21,8	32,6	22,2	33,2	26,7	35,7	27,6	26,9

Dennoch ließen sich geringe Abweichungen von der Norm feststellen. So hemmte *A 44* den *Helm.*-Stamm *H 64* stärker, die Stämme *H 44* und *H 74* dagegen weniger als den Kontrollstamm *HD*. Die *Helm.*-Stämme *H 70*, *H 73*, *H 75* und *H 117* waren gegenüber *A 46* weniger empfindlich als *HD*, während *H 50*, *H 81*, *H 82*, *H 106*, *H 112* und *H 116* auf *A 11* stärker reagierten als der Kontrollstamm. Diese Unterschiede lagen jedoch durchweg noch innerhalb der Grenzen der Aktivitätsschwankungen der einzelnen Streptomyceten bei *HD*.

Die Tests mit *H 70*, *H 73* und *H 117* gegen *A 46* und mit *A 64* gegen *A 44* wurden einmal, mit dem Stamm *H 106* gegen *A 11* zweimal und mit *H 112* und *H 116* gegen *A 11* dreimal mit ähnlichem Erfolg wiederholt. Die anderen nur wenig abweichenden Kombinationen wurden nicht nochmals geprüft. Die Unterschiede waren in keinem Fall diagnostisch zu verwerten, da keine der geprüften Rassen bei jeder Wiederholung statistisch gesicherte Differenzen ergab. Immerhin konnte somit bei 7 von 98 *Helm. pap.*-Rassen eine gewisse physiologische Verschiedenheit an Hand gradueller Sensibilitätsunterschiede nachgewiesen werden.

Eine neuentstandene Sektorvariante und 6 frischisolierte *Helm. pap.*-Stämme wiesen (mit einer Ausnahme) praktisch die gleiche antibiotische Empfindlichkeit auf wie *HD*.

4. Die Verwendung anderer Streptomycetenstämme als Antibiotiken

Um gegebenenfalls durch Erweiterung des Antagonistensortimentes doch noch deutlichere Sensibilitätsunterschiede zu erhalten (BUXTON u. RICHARDS 1955), wurden Antibioseversuche mit 8 anderen Actinomyceten aus der Institutssammlung durchgeführt, bei denen *HD*, *H 21*, *H 22*, *HS 34*, *H 57*, *H 58*, *H 109* und *H 119* als Testpilze fungierten. Dabei erwiesen sich *H 57* gegenüber Stamm *A 76* als etwas weniger und

HS 34 gegenüber Stamm *A 67* als ein wenig stärker empfindlich als alle anderen Testpilze.

Außerdem wurden je 2 Varianten von *A 11* und *A 44* und 6 von *A 60* untersucht, wobei sich einige Isolate (zum Teil nur vorübergehend wie *A 11/I*) in ihrer Hemmwirkung auf *HD* und *H 21* von ihren Elternstämmen unterschieden. Gegenüber *H 21* wiesen einige Varianten von *A 60* geringere Aktivität auf. Das könnte auf — bisher nicht nachweisbare — Sensibilitätsunterschiede zwischen *HD* und *H 21* hindeuten, jedoch traten statistisch gesicherte Differenzen nie gleichzeitig für die totale und die Gesamthemmzone auf (Tab. 8).

Tabelle 8. Hemmwirkung einiger Varianten und ihrer Elternstämme auf *HD* und *H 21* in 2 Versuchen (Bezeichnung wie in Tab. 6)

		<i>HD</i> M	Sicherung (P)	<i>H 21</i> M	Sicherung (P)
<i>A 11</i>	<i>t</i>	$2,7 \pm 0,0578$		$2,7 \pm 0,0817$	
	<i>G</i>	$4,5 \pm 0,1155$		$4,1 \pm 0,1291$	
<i>A 11/I</i>	<i>t</i>	$4,1 \pm 0,1414$	0,0002	$4,5 \pm 0,1000$	0,0002
	<i>G</i>	$6,1 \pm 0,1291$	0,0002	$5,7 \pm 0,1826$	0,0004
<i>A 11</i>		$5,1 \pm 0,0517$		$4,5 \pm 0,1414$	
<i>A 11/I</i>		$5,2 \pm 0,4082$		$4,3 \pm 0,1633$	
<i>A 44</i>	<i>t</i>	$1,9 \pm 0,1633$			
	<i>G</i>	$4,2 \pm 0,2692$		$4,5 \pm 0,0511$	
<i>A 44/I</i>	<i>t</i>	$1,6 \pm 0,0$		$3,1 \pm 0,0817$	
	<i>G</i>	$7,1 \pm 0,1633$	0,0002	$8,5 \pm 0,3921$	0,0002

5. Unterschiede in der Ausbildung der Hemmhöfe

Ebenso wie die Größe wurde auch die Entwicklung des Hemmhofs hauptsächlich vom Antagonisten bestimmt. Der Einfluß der Testpilze, den GREEN u. WAKSMAN (1948), WALLHÄUSER u. RIPPEL-BALDES (1950), WALLHÄUSER (1951 a) und MAGDON (1955) nachweisen konnten, war im vorliegenden Falle abhängig von ihren morphologischen Eigenschaften. So konnte die von *A 44* und *A 60* — und gelegentlich auch von *A 11* — hervorgerufene äußere diffuse Hemmzone bei geringer Suspensionsdichte (Spd) des Testpilzes vorhanden und bei hoher überdeckt sein. Zwischen diesen Extremen gab es alle Übergänge. Unter dem Einfluß von *A 8 g* und *A 37 g* bildeten die Teststämme *HD*, *H 21*, *H 58*, *H 96*, *H 115* und *H 116* bei mittlerer und geringer Spd außerhalb der totalen Hemmzone schmale Förderungswälle mit erhöhter Farbstoff- und Sporenproduktion. *H 21* zeigte bei Einwirkung von Antagonisten gelegentlich — wohl ebenfalls in Abhängigkeit von der Spd — eine Doppelwallbildung, bei der von innen nach außen eine Inhibitionszone, ein Förderungswall und eine Luftmycelzone aufeinander folgten (Abb. 5). Als mögliche Ursache für die Ausbildung solcher Förderungswälle

werden gleichzeitige Bildung von Reiz- und Hemmstoffen (RUSCHMANN 1951, 1952a, WALLHÄUSER 1951a), eine stimulierende Wirkung niedriger Hemmstoffkonzentrationen (WALLHÄUSER 1951a, OPPERMAN 1951, v. HOLT 1952, ZISCHKA 1955) oder Abbau von Hemmstoffen (WALLHÄUSER 1951a, REHM 1954/55) genannt.

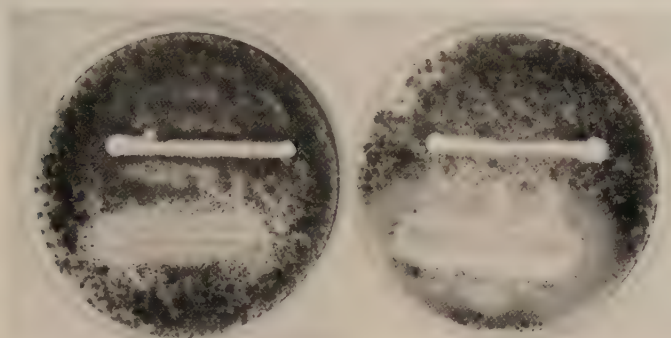


Abb. 5. Verschiedene Hemmhoftypen bei Anwendung der Testpilze *HD* (totale Hemmzone) und *H 21* (Doppelwallbildung). Der verwendete Antagonist ist *A 44*. Das Auftreten der Doppelwallbildung ist von der Koloniedichte abhängig

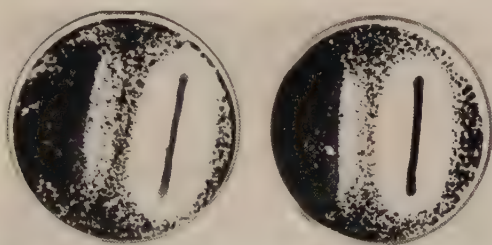


Abb. 6. Häufig auftretender einseitiger Hemmhof von *A 8* hervorgerufen durch die Überlagerung der anfangs größeren Hemmzonen von *A 8* und *A 46*

Bei *A 8* kamen gelegentlich einseitige Inhibitionszonen vor (Abb. 6), die durch die Überlagerung eines ursprünglich vorhandenen Inhibitionsbereichs von *A 8* und einer anfangs weit größeren Hemmzone von *A 46* entstanden. Es handelt sich demnach wahrscheinlich um die Summation zweier kleiner, für sich auf die Dauer unwirksamer Hemmstoffmengen.

6. Vergleichende Untersuchungen zur Sensibilität von *Helm. sativum* und *Colletotrichum atramentarium*

Zum Vergleich wurde auch die Aktivität der 8 Antagonisten gegenüber den bereits mehrfach auf ihre antibiotische Empfindlichkeit untersuchten Pflanzenparasiten *Helm. sativum* (CHRISTENSEN u. DAVIES 1940,

ANWAR 1949, STEVENSON 1954, PETERSON 1954, CHINN 1954) u. *Coll. atr.* (GEMEINHARDT 1954, ETTIG 1955a, b) geprüft. *Helm. sativum* differierte — im Gegensatz zu *Coll. atr.* — nur wenig von *HD* (Tab. 9). Es gelang also nicht, die so deutlich verschiedenen Arten *Helm. pap.* und *Helm. sativum* durch den Antibiosetest statistisch gesichert zu unterscheiden. Wie die geringe Variabilität innerhalb der Parallelen vermuten läßt, hätte sicherlich auch eine größere Anzahl von Testplatten keine wesentlich anderen Ergebnisse gebracht.

Tabelle 9. Vergleich der antibiotischen Empfindlichkeit von *Helm. sativum* (*Hs*), *Helm. pap.* (*HD*) und *Coll. atr.* (*Ca*)
(Berechnung und sonstige Bezeichnungen wie in Tab. 6)

		A 44								A 60							
		HD		Hs	HD		Ca		HD		Hs	HD		Ca			
		t	G		t	G	t	G	t	G		t	G				
M		2,8	6,2	4,7	3,2	4,5	2,2	6,6	1,9	5,5	4,9	3,5	5,5	5,1			
± m		0,1	0,4	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,0			
P							0,0035	0,001									

		A 11				A 46				A 8 g				A 37 g			
		HD	Hs	HD	Ca	HD	Hs	HD	Ca	HD	Hs	HD	Ca	HD	Hs	HD	Ca
M		4,4	3,8	5,4	5,8	10,1	8,5	7,9	8,5	3,1	3,5	3,3	4,1	3,8	4,6	3,4	4,4
± m		0,4	0,2	0,2	0,1	0,4	0,5	0,4	0,2	0,1	0,2	0,0	0,0	0,1	0,4	0,2	0,1
P													gut ges.		0,005		0,009

E. Art der Schädigung

1. Das *Helm.*-Wachstum im Hemmbereich der Antagonisten

REINHARDT (1892) fand bereits bei *Peziza*-Hyphen Absterbeerscheinungen am Hemmhofrand. Nach WEINDLING (1932, 1934) ruft *Trichoderma* entsprechende Wirkungen bei *Rhizoctonia solani* hervor. ELLIOT (1917), PORTER (1924), BRIAN u. a. (1946), OPPERMAN (1951), STEVENSON (1954, 1956) und MAGDON (1955) untersuchten ebenfalls solche bei Antibiosevorgängen auftretenden Phänomene.

Auch die Strahlenpilze *A 44* und *A 60* verursachten bei den nicht so viel Luftmycel bildenden *Helm. pap.*-Stämmen, ohne das Keimen der Conidien verhindern zu können, Veränderungen, die den Chlamydo-sporen (BALLARIN 1950) bzw. Mikrosclerotien (MEFFERT 1950) glichen. Normal gewachsene Mycelteile konnten durch einen plötzlichen starken antibiotischen Einfluß vollständig deformiert oder aufgelöst werden. Während im allgemeinen Mycelstücke im Hemmbereich schwach wuchsen und abstarben, keimten Conidien häufiger — allerdings mit angeschwollenen Hyphen — aus. Der hochaktive Stamm *A 46* verhinderte die Entwicklung von Pilzkolonien in einem weiten Bereich und ließ am Hemmzonenrand nur schmale Hyphen aufkommen. *A 11* rief unregelmäßige

Kolonien mit (bei normal pigmentierten und sporulierenden Stämmen) \pm stark blasig angeschwollenen, reich septierten Keimhyphen (Abb. 7) hervor. Unter dem Einfluß (Förderungszone!) von *A 8 g* und *A 37 g* entwickelten sich stark angeschwollene, manchmal sogar platzen- de Hyphen mit dichotomen Endverzweigungen, die unter Umständen wieder auskeimen konnten und wahrscheinlich in ihrer Entwicklung gebremste Conidienträger darstellen (Abb. 8). Auf

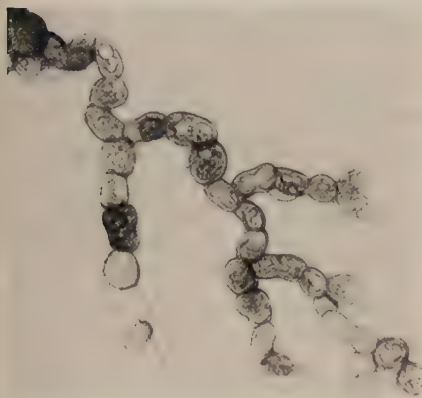


Abb. 7. Bei Anwendung von *A 11* häufig entstehende Involutionshyphen von *Helm. pap.* Vergr. 640 mal

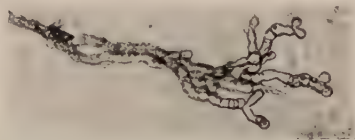


Abb. 8. *A 8 g* und *A 37 g* veranlaßten *Helm. pap.* zur Bildung solcher steckengebliebener Conidienträger. Vergr. 160 mal

anderen Medien als dem Nährboden 2 waren die Reaktionen zum Teil anders. — *Helm. sativum* wurde in seiner Wuchsform von *A 44*, *A 60* und *A 11* nicht nennenswert beeinflußt, lediglich *A 8 g*, *A 37 g* und (anders als bei *Helm. pap.*!) *A 46* ließen stark verdickte Involutionshyphen entstehen.

2. Direkteinwirkung von Streptomyceten auf *Helm. pap.*

Neben der durch Hemmstoffe veranlaßten Fernwirkung konnte auch ein direkter Angriff des Antagonisten auf den Testpilz beobachtet werden.

WEINDLING (1932, 1934) sah die direkte Einwirkung von *Trichoderma lignorum* auf andere Pilze. Andere Autoren stellten im Boden Angriffe von Strahlenpilzen auf *Ophiobolus graminis* bzw. *Fusarium spec.* (WINTER 1949), *Helm. pap.* (LANGE 1953), *Helm. sativum* (STEVENSON 1956) und — in vitro — *Aspergillus*-Hyphen (REHM 1954/55) fest.

In den vorliegenden Untersuchungen traten ähnliche Erscheinungen bei den Stämmen *A 44* und *A 60* auf, für deren vegetative Hyphen junge Kolonien von *HD* eine Reizquelle darstellen (Abb. 9). Danach entwickelten sich die vegetativen Hyphen des

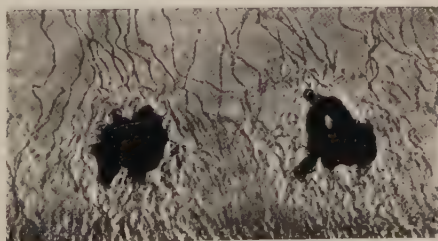


Abb. 9. Chemotropische Reizwirkung junger *Helm. pap.*-Kulturen auf Primärmycel von *A 44*. Man sieht die Häufung der Actinomyceten um die Pilzkolonien und das erste Auftreten von Sekundärmycel (rechter Rand der linken Kolonie). Vergr. 160 mal

Actinomyceten in unmittelbarer Umgebung der Kolonien besonders stark, drangen dabei (durch Auflösen oder Durchbohren der Membran) in die *Helm.*-Hyphen ein, durchwucherten sie (Abb. 9) und gliederten sehr bald Luftmycel ab (siehe REHM 1954/55). Es war nicht möglich, zu klären, ob die beobachtete Plasmaabtötung während, vor oder nach dem Eindringen der Strahlenpilze erfolgte.

Unterschiede im Sinne einer Biotypendifferenzierung beim parasitären Befall von *Helm.*-Hyphen durch Actinomyceten konnte nicht beobachtet werden.

F. Die Wirkung der mehrfachen Sterilisation des Testnährbodens

1. Sterilisierungsversuche

Auf einigen, zufällig mehrfach sterilisierten Platten zeigten sich wesentlich kleinere Hemmhöfe, zum Teil mit Förderungszonen, und vermindertes Antibiontenwachstum.

Um dieser Erscheinung nachzugehen, wurde frischbereiteter Nährb. 2 (pH 6,6) mit (Reihe A) und ohne (Reihe B) Agarzusatz 1, 2, 3 oder 4 mal bei 120° C und 1 atü im Autoklaven sterilisiert. Anschließend erfolgte die cH⁺-Einstellung mittels KOH auf pH 6,7 und bei Reihe B der Zusatz der entsprechend gewässerten Agarmenge (3%). Dann wurden die Substrate in Petri-Schalen eingefüllt (10 ml), danach nochmals bei 120° C (ein bisher noch nicht erhitztes Gefäß bei 110° C) sterilisiert und zum Schluß die cH⁺ in parallel mitgeführten Hochschichtröhrchen (mittels Lyphanpapier gemessen (Tab. 10). Die Reduktionskraft, sichtbar gemacht mit TTC, nahm vom unsterilisierten (schwach rosa) bis zum 5 mal sterilisierten Substrat (intensiv rot) ständig zu, während die Jod-Stärke-Reaktion unverändert blieb. Es wurde mit A 8 g und A 37 g bzw. A 8 und A 46 beimpft und nach 3 Tagen mit den in Vorversuchen bewährten Stämmen HD, H 58 und H 57 besprüht.

Tabelle 10. Wachstum der Actinomyceten und Versauerung nach mehrfachem Sterilisieren des Nährbodens 2

Zahl der Sterilisierungen	Reihe A			Reihe B		
	pH	Wachstum von A 8 g/37 g A 8/46		pH	Wachstum von A 8 g/37 g A 8/46	
1 × bei 110°	6,3	normal	normal	6,3	normal	normal
1 × bei 120°	6,2	normal	normal	6,0	normal	normal
2 × bei 120°	6,2	(normal)	normal	6,2	schwach	schwach
3 × bei 120°	6,0	schwach	(normal)	5,3	schlecht	schlecht
4 × bei 120°	6,0	schwach	(normal)	5,5	0	
5 × bei 120°	5,6		0	5,3	0	
unsterilisiert	6,6			6,6		

Das Wachstum der Actinomyceten und die Hemmwirkung von A 8 g und A 37 g ließen mit zunehmendem Sterilisieren nach, und zwar in Reihe B stärker als in Reihe A (Tab. 10, Abb. 10). Entsprechend

vergrößerten sich die Förderungszonen. Die relative Hemmhofgröße von *A 46* (Abb. 10) wurde dagegen zunächst nicht kleiner. Das Mitsterilisieren des Agars (Reihe A) trug offensichtlich zur Milderung des Vitalitätsabfalls der Streptomyceten bei.

Wurde eine Reihe schlechtbewachsener Platten (Reihe A 3mal, Reihe B 5mal) noch einige Tage länger bebrütet, so konnten die Actinomyceten nach insgesamt 9 Tagen Vorbebrütung besprüht werden und wiesen 6 Tage danach normale Aktivität auf (die Mittelwerte $H:K$ lagen für H 58 als Testpilz zwischen 3,2 und 4,0). Demnach verlangsamte (oder verhinderte) die mehrfache Sterilisierung nur das Wachstum der Strahlenpilze und nicht die Bildung oder Ausbreitung ihrer Hemmstoffe.

2. Die chromatographische Untersuchung der sterilisierten Nährlösungen auf reduzierende Zucker

Zur chromatographischen Untersuchung wurden 0,1 und 1,0 ml der einzelnen Sterilisierungsstufen der Reihe B auf Whatman 1-Papier aufgetragen. Als Vergleichssubstanzen dienten Glucose, Arabinose, Maltose, Galaktose, Xylose und Fructose (5 und 20 μ je Startpunkt). Es wurde aufsteigend gearbeitet mit Phenol als Lösungsmittel. Die Entwicklung erfolgte mit Anilinchthalat (CRAMER 1953).

Die Chromatogramme aller Sterilisationsstufen zeigten braune Flecke ($R_f = 0,38$), die einerseits mit der Maltose ($R_f = 0,37$) und andererseits mit Glucose ($R_f = 0,41$) ungefähre Lage und Färbung gemeinsam hatten, und schwach braune bei $R_f = 0,53$. Daneben traten noch braune bis rotbraune Flecke ($R_f = 0,83$) auf, die mit der Anzahl der Sterilisierungen an Farbstärke und Größe ständig zunahmen. Es könnte sich dabei um Lactone von Zuckersäuren handeln, für die derartig hohe R_f -Werte bekannt sind.

Die von CRAMER (1953) empfohlene Verwendung von ammoniakalischem Phenol als Lösungsmittel zur Umlagerung der Lactone zu normalen Säuren war ohne Erfolg. Die Identifizierung dieser möglicherweise für die Wachstums hemmung verantwortlichen Stoffe konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht in Angriff genommen werden.

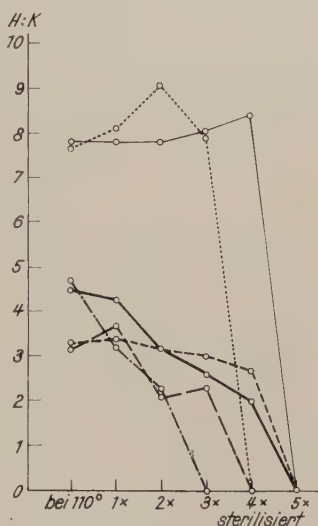


Abb. 10. Abfall der Hemmwirkung der Stämme *A 8g*, *A 37g* und *A 46* (Testpilz *HD*) bei verschiedenen sterilisierten Nährböden. Bei Reihe A wurde Agar sofort, bei Reihe B erst vor dem letzten Sterilisieren zugefügt.

Reihe A: *A 8g* —○— *A 37g* ---○---

A 46 + + +. Reihe B: *A 8g* —○— *A 37g* ---○---

A 46 + + + *A 46*

Erwartungsgemäß beeinflussten Glucose-, Galaktose-, Arabinose-, Fructose- und Maltosezusätze in entsprechend gut nachweisbaren Konzentrationen von 20 und 5 γ (bei Glucose außerdem 40 γ) je Milliliter die antibiotische Wirkung nicht.

G. Besprechung der Ergebnisse

Die Arbeit sollte klären, ob sich mit Hilfe eines einfachen Antibiose-vitaltests physiologische Unterschiede innerhalb einer Reihe morphologischer Rassen von *Helminthosporium papaveris* feststellen lassen. Das Agar-Strichtestverfahren schien dabei die geeignetste Methode zu sein, da sich in Übereinstimmung mit DÖLLE (1954a, b) im Lochtest nur einer der untersuchten Strahlenpilze als aktiv erwies. Diesen auffallenden Unterschied zwischen Vital- und Lochtest kann man vielleicht auf Inaktivierung der untersuchten Filtrate durch Oxydation beim Absaugen (WAKSMAN 1947, HERREL-SCHULZE 1949, WALLHÄUSER 1951b, RUSCHMANN 1952b) oder auf die generelle Unfähigkeit zur Hemmstoffbildung in Flüssigkeiten zurückführen, wie es GARDNER u. CHAIN (1942) für Proactinomycin sowie FAINSCHMIDT u. KORENIAKO (1944) für Mycetin nachgewiesen haben.

Wie eine Anzahl von Versuchen zur Methodik zeigten, eignete sich als Vitaltest besonders gut das Sprühverfahren nach STESSEL u. a. (1953). Da der Inhibitionshoftyp (Ausbildung einer totalen oder diffusen Hemmzone oder eines Förderungswalles) nicht nur vom Antagonisten und den morphologischen Eigenschaften der Teststämme, sondern auch von der Dichte der Sporensuspension abhängig war, konnte nur die weitgehend unabhängige Hemmhofgröße zum Sensibilitätsvergleich herangezogen werden. Wegen Schwankungen innerhalb der Versuchsreihe wurde die Hemmhofbreite im Verhältnis zur jeweiligen Koloniebreite bewertet (relative Hemmhofbreite), wofür bei allen Antagonisten eine \pm deutliche positive Korrelation und geringste Streuung gegenüber anderen Berechnungsmöglichkeiten festgestellt worden war.

Die zunächst viel größeren Hemmhöfe hatten etwa am 6. bis 7. Tage ihre Stabilität erreicht. Wie durch Entfernen der Antagonistenkolonie und Besprühen in Etappen nachgewiesen wurde, war der Hemmstoff im Agar nur kurze Zeit wirksam. Demnach ist die endgültige Inhibitionszone vielleicht als der Einflußbereich eines kurzlebigen, ständig nachgebildeten Hemmstoffes anzusehen. Der äußere diffuse Hemmhof wäre dann auf geringere Hemmstoffkonzentration zurückzuführen. Weitere Bildungsmöglichkeiten diskutieren WALLHÄUSER (1951a) und MAGDON (1955).

Da beim Vergleich der Sensibilität von *HD* während aller Tests mit der Empfindlichkeit aller anderen *Helm. pap.*-Rassen zusammengekommen eine weitgehende Übereinstimmung in Mittelwert und Streuung

festzustellen war, konnte man von vornherein für die Einzelanalyse keine Abweichung einzelner *Helm.*-Rassen vom Kontrollstamm *HD* erwarten. Große Unterschiede hätten eine stärkere Streuung der Sensibilitäten ergeben müssen als die *HD*-Teste. Dennoch traten bei einigen Stämmen geringe zum Teil gesicherte Empfindlichkeitsunterschiede auf, die allerdings bei den einzelnen Wiederholungen im Grad ihrer Sicherheit schwankten. Man kann daher das Strichtestverfahren zwar zur Feststellung physiologischer Unterschiede zwischen *Helm.*-Rassen benutzen, jedoch erscheint eine diagnostische Verwertung zur Identifizierung eines Biotypen infolge ungenügender Sicherheit nicht möglich. Die Verwendung anderer Antagonisten und einiger Dissozianten der 8 Strahlenpilze änderte an dieser Erkenntnis nichts.

Neuisolierungen und eine Sektorvariante von *Helm. pap.* zeigten keine charakteristischen Unterschiede zum Kontrollstamm, während *Helm. sativum* ein etwas anderes, jedoch statistisch nicht gesichertes Verhalten aufwies. *Colletotrichum atramentarium* reagierte demgegenüber eindeutig verschieden von *HD*. Das zeigt deutlich, daß der Antibiosetest nur begrenzt geeignet ist, physiologische Unterschiede (und sei es zwischen Arten!) quantitativ zu erfassen. Allerdings sind diese vielleicht nur gering; so konnte auch MARTIN (1954) bei *Candida reukauffii* nur morphologische aber keine physiologischen Differenzen zwischen Eltern- und Sektorstämmen nachweisen. Wegen der Geringfügigkeit der Sensibilitätsunterschiede zwischen den *Helm.*-Rassen kann angenommen werden, daß sich alle *Helm. pap.*-Typen im natürlichen Boden so verhalten wie die von GRÜMMER (1950) und LANGE (1953) untersuchten Stämme.

BUXTON u. RICHARDS (1955) testeten 8 Linien von *Fusarium oxysporum* gegen 16 verschiedene Bodenactinomyceten, wobei der geringste Abstand zwischen den in parallelen Strichen aufgeimpften Antagonisten und Testorganismen als Vergleichsmaßstab diente. Auf 4 Stämme reagierten die einzelnen Pilzrassen unterschiedlich. Dieser im Zylinder-test bestätigte Befund erfaßt aber praktisch nur die gegen die Hyphen, nicht aber die gegen die Conidien gerichteten, fungistatischen Eigenschaften der Streptomyceten, die für das Verhalten im Boden gleichfalls wichtig sind. Die bei *Helm. pap.* beobachteten geringen Differenzen traten entsprechend den Angaben von BUXTON u. RICHARDS nur bei Anwendung von 3 der 8 Strahlenpilze auf.

Direkter Aktinomycetenbefall, wie ihn WINTER (1949) bei *Ophiobolus graminis* und *Fusarium spec.*, LANGE (1953) bei *Helm. pap.* und REHM (1954/55) bei *Aspergillus niger* beobachtet hatten, konnte für 2 geeignete, zunächst nicht fungicid wirkende Strahlenpilze nachgewiesen werden, ohne daß momentan eine Erklärung hierfür möglich ist. Die jungen Pilzkolonien sind bevorzugte Entstehungsorte für Luftmycel. Ob mit dem Eindringen in das Pilzmycel eine verstärkte Bildung von Initialzellen im

Sinne von KLIENEGER-NOBEL (1947) verbunden ist oder ob das Ausbrechen des Sekundärmycel auf andere Ursachen zurückgeführt werden kann, muß dahingestellt bleiben.

Die Fernwirkung der Strahlenpilze konnte sich in einer Unterdrückung der Conidienkeimung, in einer \pm starken Verminderung des Wachstums schon vorhandener junger Kolonien oder in morphologischen Veränderungen bzw. völliger Zerstörung des *Helm.*-Mycels äußern und war für den Antagonisten spezifisch, richtete sich jedoch auch nach dem aufgesprützten Hyphen- und Conidienmaterial. Versprühte Hyphen waren in der Regel empfindlicher als Conidien. Das Entstehen aufgetriebener Hyphenformen erklärt man sich heute durch die Einwirkung von Hemmstoffen auf die Pilz- und Bakterienzellen in Form von Osmosegiften (GÄUMANN u. a. 1952), die in der Zellwand abgelagert werden (FEW u. SCHULMAN 1953) und die Permeabilität maßgebend beeinflussen (KAUNAT 1955). Andere Autoren vermuten eine Wirkung auf den Säurestoffwechsel (UMBREIT 1953 für Streptomycin) oder die Decarboxylase-Synthese (GRÜNBERGER u. ŠORM 1955). Träfen eine oder mehrere dieser Ansichten tatsächlich zu, wäre die erhöhte Wasseraufnahme, die bis zum Platzen führen kann, erklärlich.

Auf die Bedeutung der Redox-Verhältnisse für den Antagonismus der Bakterien in Mischkulturen wies CHARLTON (1955) hin. WAKSMAN u. a. (1952) machten die Beeinflussung des Redoxpotentials der Zellen für die Hemmwirkung verantwortlich. Nach MYRVIK u. VOLK (1954) wirken reduzierende Substanzen, wie z. B. Ascorbinsäure, antibakteriell; v. PLOTHO (1948) erhielt bei Zusatz von Na_2SO_3 zum Nährboden eine Senkung des Redoxpotentials und damit eine verstärkte Antibioticawirkung. Auch diskutiert man die Möglichkeit einer direkten Einwirkung antibiotischer Substanzen auf die Proteinsynthese (z. B. KNIGHT 1952).

Welche Erscheinungen im hier erörterten Falle vorliegen, steht völlig offen.

Mehrfache Sterilisierung des Testsubstrats führte zum Rückgang des Wachstums und der Hemmwirkung der Strahlenpilze, und zwar besonders stark dann, wenn die Nährmedien noch ohne Agarzusatz sterilisiert wurden. Dieses Gelierungsmittel „pufferte“ offenbar das Nährmedium und verminderte dabei die Wirksamkeit der beim Sterilisieren entstehenden Faktoren. Da die Versauerung des Mediums mit KOH ausgeglichen wurde, war eine direkte Säureeinwirkung nicht wahrscheinlich. Im Chromatogramm traten — mit steigender Sterilisierung immer deutlicher — Flecke auf, die als Lactone von reduzierend wirkenden Zuckern deutbar sind. Zuckersäuren sind bei Hitzesterilisierung von stärke- und malzhaltigen Medien zu erwarten (DAVIS u. ROGERS 1939, JANKE 1946). Allerdings könnte man auch an die Bildung reduzierender Zucker denken (GREEN u. WAKSMAN 1948, VOGEL 1951, DÖLLE 1954b). Nach KARSTRÖM (1931), TAUBENECK (1953) u. a. stimulieren Zucker das

Bakterienwachstum, und RUSCHMANN (1955) beobachtete Förderungs-zonen ausschließlich auf zuckerhaltigen Nährböden, während FINKELSTEIN u. LANKFORD (1957) berichteten, daß eine Glucose und Phosphat enthaltende Nährbrühe nach dem Autoklavieren hemmend auf *Vibrio cholerae* wirkte.

Im vorliegenden Falle traten reduzierende Zucker bereits vor der ersten Sterilisation stark auf, ohne daß Aktivität und Wachstum der Actinomyceten vermindert waren. Geringe Glucose- und andere Zuckerzusätze zum normalen, einmal sterilisierten Testagar verursachten keine Aktivitätshemmung. Interessanterweise ergab reiner, für den Pilz ungünstiger Stärkeagar im Lochtest eine größere Hemmwirkung als der normale Testnährboden.

Zusammenfassung

1. Aus einer für Antibioseuntersuchungen eingerichteten Stammsammlung wurden von 33 geprüften Streptomyceten 8 unterschiedlich wirksame Stämme für die Sensibilitätsteste gegenüber *Helminthosporium papaveris* ausgewählt.

2. Es wurde der Einfluß des Impfverfahrens, der Dichte der Testpilzsuspension, die Wirkung des Nährbodens und seiner cH^+ auf die Hemmhofgröße, der zeitliche Ablauf der Antibiosewirkung und die Beeinflussung der Antagonisten durch die Testpilze untersucht.

3. Sämtliche Tests der 6 aktiven Streptomyceten mit dem Kontrollstamm *HD* wurden zusammengestellt und die „relative Hemmhofbreite“ (Hemmhof-/Koloniebreite) als beste Vergleichsgrundlage gefunden.

4. Die Hemmhofgrößen aller untersuchten *Helm. pap.*-Stämme bei Anwendung je eines der 6 aktiven Strahlenpilze wurden zusammengekommen und der Hemmwirkung dieses Antagonisten auf *HD* gegenübergestellt. Es ergab sich weitgehende Übereinstimmung der Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten.

5. Keiner der etwas von der Norm abweichenden Stämme zeigte bei allen Wiederholungen statistisch gesicherte Abweichungen.

6. Neuisolierungen und eine Sektorvariante von *Helm. pap.* sowie ein *Helm. sativum*-Stamm wiesen — im Gegensatz zu *Colletotrichum atramentarium* — keine nennenswerten Veränderungen der Reaktion gegenüber dem Kontrollstamm auf.

7. Bei Verwendung von Dissozianten mehrerer Antagonisten und 8 weiteren Strahlenpilzstämmen zeigten die geprüften *Helminthosporien* in einigen Fällen etwas vom Kontrollstamm abweichende Reaktionen.

8. Die Reaktion der *Helm. pap.*-Kolonien auf die Beeinflussung durch die Antagonisten hing von ihrer morphologischen Eigenart ab. Ein direkter Befall der Pilzhyphen durch Streptomyceten konnte vielfach beobachtet werden.

9. Durch mehrfaches Sterilisieren des Testsubstrates trat bei den Strahlenpilzen eine Wachstums- und Aktivitätsverzögerung ein, und zwar besonders, wenn Agar-Agar erst vor dem letzten Erhitzen zugesetzt wurde. Bei der chromatographischen Untersuchung auf reduzierende Zucker traten Flecke von hohem R_f -Wert auf, die als Uronsäurelactone gedeutet werden können.

Herrn Prof. Dr. H. WARTENBERG danke ich für die Stellung des Themas und für ständige Unterstützung während der Arbeit. Auch allen denjenigen, die mir freundlicherweise Stämme zur Verfügung stellten, sei hiermit herzlich gedankt.

Literatur

- ANWAR, A. A.: *Phytopathology* **39**, 1005—1019 (1949).
 BALDACCI, E., C. SPALLA u. A. GREIN: *Arch. Mikrobiol.* **20**, 347—357 (1954). — BAL-LARIN, C.: *Phytopath. Z.* **16**, 399—442 (1950). — BERGEY, D. H.: *Manual of deter-minative bacteriology*. 6. ed. London: 1948. — BRIAN, P. W., P. J. CURTIS and H. G. HEMMING: *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **29**, 173 (1946), zit. nach STEVENSON 1954. — BUXTON, E. W., and MARILYN G. RICHARDS: *J. Gen. Microbiol.* **13**, 99—102 (1955).
 CHARLTON, G.: *J. Bacter.* **70**, 56—59 (1955), ref. in *Ber. wiss. Biol.* **101**, 118. — CHINN, S. H. F.: *Canad. J. Microbiol.* **1**, 118—124 (1954), ref. in *Ber. wiss. Biol.* **94**, 372. — CHRISTENSEN, J. J., and F. R. DAVIES: *Phytopathology* **30**, 1017 (1940), zit. nach WALLHÄUSER 1951a. — CRAMER, F.: *Papierchromatographie*. Weinheim. 2. Aufl. 1953.
 DAVIS, J. G., and H. J. ROGERS: *Zbl. Bakter. II*, **101**, 102—110 (1939). — DÖLLE, H.: *Zbl. Bakter. II*, **108**, 127—133 (1954a). — *Nachrbl. dtsh. Pflanzen-schutzdienst N. F.* **8**, 191—193 (1954b). — DULANEY, E.: *Mycologia* **41**, 1—10 (1949).
 EISER, H. M., and MCFARLANE: *Canad. J. Res., Sect. C*, **26**, 164—173 (1948). — ELLIOT, J. A.: *Amer. J. Bot.* **4**, 439 (1917), zit. nach STEVENSON 1954. — ERIKSON, D.: *Ann. Rev. Microbiol.* **3**, 23—54 (1949). — ETTIG, B.: *Zbl. Bakter. II*, **108**, 530—535 (1955a); **108**, 602—610 (1955b).
 FAINSCHMIDT, O., and A. KORENIAKO: *Biochemija* **9**, 147—152 (1944), zit. nach BENEDICT and LANGLYKKE: *Ann. Rev. Microbiol.* **1**, 193—236 (1947). — FEW, A. V., and J. H. SCHULMAN: *J. Gen. Microbiol.* **9**, 454—466 (1953). — FINKELSTEIN, R. A., and C. E. LANKFORD: *Appl. Microbiol.* **5**, 74—79 (1957). — FLEMING, A.: *Brit. J. Exp. Path.* **10**, 226 (1929), zit. bei KILLIAN „Die Penicilline“. Freiburg: 1948. — FROMMER, W.: *Arch. Mikrobiol.* **25**, 219—222 (1956).
 GÄUMANN, E.: *Pflanzliche Infektionslehre*. Basel (1951). — GÄUMANN, E., ST. NAEF-ROTH, P. REUSSER u. A. AMANN: *Phytop. Z.* **19**, 160—220 (1952). — GARDNER, A. D., and E. CHAIN: *Brit. J. Exper. Path.* **23**, 123—127 (1942), zit. nach BENEDICT: *Bot. Rev.* **19**, 229—320 (1953). — GEMEINHARDT, H.: *Nachrbl. dtsh. Pflanzenschutzdienst N. F.* **8**, 226—229 (1954). — GREEN, S. R., and S. A. WAKSMAN: *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **67**, 281—285 (1948). — GRÜMMER, G.: *Diplom-arbeit Jena* 1950. — GROSSBARD, E.: *J. Gen. Microbiol.* **6**, 295—310 (1952). —

GRÜNBERGER, B., and F. ŠORM: Coll. czechoslov. chem. Comm. **20**, 36—40 (1955), ref. Ber. wiss. Biol. **98**, 107.

HERREL, W. E., u. E. SCHULZE: Penicillin und andere Antibiotica. Stuttgart 1949, zit. nach WALLHÄUSER 1951 b. — HOLT, C. v.: Dtsch. med. Wschr. **1952**, 341. — HUMPHREY, J. H., and J. W. LIGHTBOWN: J. Gen. Microbiol. **7**, 129—143 (1952).

JANKE, A.: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. Dresden und Leipzig: 1946. — JOHANNSEN, W.: Elemente der exakten Erbliehkeitslehre. Jena: 1926. — JONES, K. L.: J. Bacter. **51**, 211—216 (1946), zit. nach ERIKSON 1949.

KARSTRÖM, H.: Ann. Acad. Sci. fenn. A. **33**, 2 (1931), zit. nach TAUBENECK 1953. — KAUNAT, H.: Protoplasma (Wien) **45**, 1—36 (1955). — KLIENEBERGER-NOBEL, E.: J. Gen. Microbiol. **1**, 22 (1947) — KNIGHT, C. J. G.: Bull. Org. mont. Santé **6**, 229—248 (1952), ref. Ber. wiss. Biol. **82**, 98. — KNÖLL, E.: Dtsch. Gesundheitswesen **1**, 161 (1946). — Pharmazie **2**, 392—396 (1947). — KÖHLER, H.: Nachrbl. dtsch. Pflanzenschutzdienst N. F. **4**, 161—164, 185—193 (1950); N. F. **7**, 12—18, 72—78, 108—113 (1953). — Einführung in die Methodik der pflanzlichen Antibiotikaforschung. Berlin 1956. — KRASSILNIKOW, N. A.: Bestimmungsbuch für Bakterien und Actinomyeten. Moskau-Leningrad: 1949. Nach einer unveröffentlichten Übersetzung von G. M. HOFFMANN. — Sowjetwiss., Naturwiss. Abt. **1954**, 453.

LANGE, E.: Diplomarbeit Jena 1953. — LINDENBEIN, W.: Arch. Mikrobiol. **17**, 361 (1952).

MAGDON, E.: Zbl. Bakter. II, **108**, 703—716 (1955). — MARTIN, H. H.: Arch. Mikrobiol. **20**, 141—162 (1954). — MEFFERT, M. E.: Z. Parasitenkde. **14**, 442 bis 498 (1950). — MYRVIK, Q. N., and W. A. VOLK: J. Bacter. **68**, 622—626 (1954), ref. Ber. wiss. Biol. **96**, 105.

NISSEN, T. V.: Tidskr. Planteavl **56**, 633—659 (1953), ref. Ber. wiss. Biol. **89**, 123.

OPPERMANN, A.: Arch. Mikrobiol. **16**, 364—409 (1951).

PÄTAU, K.: Biol. Zbl. **63**, 152—168 (1943). — PERLMAN, D., R. B. GREENFIELD jr., and E. O'BRIEN: Appl. Microbiol. **2**, 199—202 (1954), ref. Ber. wiss. Biol. **93**, 268. — PETERSON, E. A.: Antibiot. and Chemoth. **4**, 145—149 (1954). — PFENNIG, N.: Diss. Göttingen 1952. — Arch. Mikrobiol. **18**, 327—341 (1953). — PLOTHO, O. v.: Arch. Mikrobiol. **11**, 33 (1940); **14**, 142—153 (1948). — PORTER, L. C.: Amer. J. Bot. **11**, 168 (1924).

REHM, H. J.: Wiss. Z. Univ. Greifswald **3**, 5—15 (1953/54). — Wiss. Z. Univ. Greifswald. math.-nat. Klasse **4**, 39—44 (1954/55). — REINHARDT, M. O.: J. wiss. Bot. **23**, 479—566 (1892). — REINMUTH, E.: Angew. Bot. **24**, 273 (1942). — RUSCHMANN, G.: Pharmazie **6**, 369—377 (1951); **7**, 5—9 (1952a); **7**, 542—550 (1952b); **7**, 639—648 (1952c); **7**, 823—831 (1952d). — Biol. Zbl. **73**, 610 (1954). — Pharmazie **10**, 535—541 (1955).

SCALES, F. M.: Zbl. Bakter. II, **44**, 661—663 (1916). — SCHATZ, A., and S. A. WAKSMAN: Proc. Nat. Acad. Sci. **31**, 129—137 (1945). — SCHLIWA, B.: Diplomarbeit Jena (1955). — SCHMIEDEKNECHT, M.: Arch. Mikrobiol. **28**, 404—416 (1958). — SKOLAUDE, E., u. H. WARTENBERG: Naturwissenschaften **43**, 526—527 (1956). — STALLINGS, J. H.: Bacter. Rev. **108**, 131—146 (1954), ref. Ber. wiss. Biol. **93**, 152. — STESSEL, G. J., C. LEBEN and G. W. KEITT: Mycologia **45**, 325—334 (1953). — STEVENSON, I. L.: Nature (Lond.) **174**, 598—99 (1954). — J. Gen. Microbiol. **15**, 372—380 (1956). — STOLL, A., A. BRACK u. J. RENZ: Schweiz. Z. allg. Path. **15**, 591—597 (1952).

TAUBENECK, U.: Zbl. Bakter. I, Orig. **159**, 414—420 (1953). — Nachrbl. dtsch. Pflanzenschutzdienst N. F. **8**, 56 (1954).

UMBREIT, W. W.: Pharmacologic. Rev. **5**, 275—284 (1953), ref. Ber. wiss. Biol. **90**, 253.

VOGEL, H.: Die Antibiotika. Nürnberg 1951, zit. nach DÖLLE 1954 b.

WAGNER, H.: Diplomarbeit Jena 1955. — WAKSMAN, S. A.: Microbial antagonisms and antibiotic substances. New York 1947. — The Actinomycetes. Their nature, occurrence, activities and importance. Waltham, Mass. 1950. — Siehe BERGEY 1948. — WAKSMAN, S. A., and A. SCHATZ: Proc. Nat. Acad. Sci. **31**, 208—214 (1945). — WAKSMAN, S. A., A. H. ROMANO, H. LECHEVALLIER and F. RAUBITSCHKE: Bull. Org. Mont. Santé **6**, 163—172 (1952), ref. Ber. wiss. Biol. **81**, 411. — WALLHÄUSER, K.-H., u. A. RIPPEL-BALDES: Naturwissenschaften **37**, 450 (1950). — WALLHÄUSER, K.-H.: Arch. Mikrobiol. **16**, 201—236 (1951 a); **16**, 237—251 (1951 b). — Naturwissenschaften **38**, 190 (1951 c). — WEBER, ERNA: Grundriß der biologischen Statistik. Jena (1956). — WEINDLING, R.: Phytopathology **22**, 837 (1932); **24**, 1153 (1934). — WINTER, G.: Arch. Mikrobiol. **14**, 240—270, 588—593 (1949). — WILLIAMS, A. M., and E. MCCOY: Appl. Biol. **1**, 307—313 (1953), ref. Ber. wiss. Biol. **89**, 354. — WOOD, K. S., and M. TWEIT: Bot. Rev. **21**, 441—492 (1955). ZISCHKA, W.: Zbl. Bakter. I, Orig. **163**, 526—529 (1955).

Berichtigung

zu der Arbeit R. NÄVEKE, Band **27**, S. 375—399

S. 386, letzte Zeile, S. 387, 1. und letzte Zeile, und S. 388, 3. Zeile, lies jeweils mm anstatt mmol und μMol anstatt μmol .

Autorenverzeichnis

- BEDERKE, B., s. HARDER, R. S. 153
- BENDER, H., Studien zum L-Cyclus der Bakterien. (Nach Untersuchungen an *Proteus vulgaris* unter dem Einfluß von Penicillin.) S. 18.
- , Studien zum Gestaltwandel der Bakterien. (Bildung sarcinaähnlicher Formen bei einem gramnegativen, unbeweglichen Stäbchen.) S. 34
- BHAT, J. V., s. KHAMBATA, S. R. S. 69
- CAPRIOTTI, A., *Torulaspora nilssoni* nov. spec. A new yeast from Swedish soils. S. 247
- , Neue Hefen, isoliert aus Böden Spaniens II: *Torulaspora franciscae* nov. spec. S. 338
- , *Debaryomyces castellii* nov. spec. Eine neue Hefe aus Boden Schwedens. S. 344
- DÖLLE, H., Untersuchungen an farblosen und rhodomycinbildenden Stämmen von *Streptomyces purpurascens* Lindenbein. S. 89
- DREWS, G., Die granulären Einschlüsse der Mycobakterien. S. 369
- FOGG, G. E., s. MILLER, J. D. A. S. 1
- FUCHS, W. H., und A. GAERTNER, Untersuchungen zur Keimungsphysiologie des Schwarzrostes *Puccinia graminis tritici* (Pers.) Erickss. u. Henn. S. 303
- FUHS, G. W., Bau, Verhalten und Bedeutung der kernäquivalenten Strukturen bei *Oscillatoria amoena* (Kütz.) Gomont. S. 270
- GAERTNER, A., s. FUCHS, W. H. S. 303
- GIRBARDT, M., Über die Substruktur von *Polystictus versicolor* L. S. 255
- GREGORIO, P. DE, s. TERRANOVA, T. S. 126
- GREVE, E., Untersuchungen über das Atmungsverhältnis von Hefen. II. Die Bedeutung der Zuckerkonzentration. S. 325
- GRISS, G., s. WIELAND, TH., und B. HACCUS. S. 383
- HACCUS, B., und O. HELFRICH, Untersuchungen zur mikrobiellen Benzol-oxydation. II. Beschreibung und systematische Stellung benzolabbauender Mikroorganismen. S. 394
- , s. GRISS, G., und TH. WIELAND. S. 383
- HARDER, R., und B. BEDERKE, Über Wachstumsversuche mit Rot- und Grünalgen (*Porphyridium cruentum*, *Trailliella intricata*, *Chlorella pyrenoidosa*) in verschiedenfarbigem, energiegelichen Licht. S. 153
- HELFRICH, O., s. HACCUS, B. S. 394
- HRUSCHKA, H., Untersuchungen über den Schwefelumsatz von *Aspergillus niger*. S. 219
- JENSEN, H. L., Biological Transformation of Thiourea. S. 145
- KATING, H., s. STEINER, M. S. 173
- KHAMBATA, S. R., and J. V. BHAT, A Contribution to the Study of the Intestinal Microflora of Indian Earthworms. S. 69
- LYE, H., Die Induktion der Laccase-Bildung bei *Collybia velutipes* Curt. S. 310
- MARKOV, K. Iw., und G. K. SAEV, Veränderungen des elektrokinetischen Potentials bei penicillinresistenten und penicillinempfindlichen Staphylokokken nach der Bearbeitung mit Fermenten. S. 130
- MILLER, J. D. A., and G. E. FOGG, Studies on the Growth of Xanthophyceae in Pure Culture. I. The mineral nutrition of *Monodus subterraneus* Petersen. S. 1
- NÁVÉKÉ, R., Berichtigung S. 442
- NAUMANN, K., Über das Verhalten verschiedener morphologischer Rassen von *Helminthosporium papaveris* Saw. gegenüber unterschiedlich aktiven Strahlenpilzstämmen. S. 417
- NOLTE, E.-M., Untersuchungen über Ernährung und Fruchtkörperbildung von Myxobakterien. S. 191

- PETRAS, E., Über die Wirkung von Kobalt-Ionen auf das Cytochromsystem und die Katalase-Aktivität von *Proteus vulgaris* Hauser. S. 138
- PRAUSER, H., Untersuchungen an *Microthamnion kützingianum* Naeg. S. 81
- RIPPEL-BALDES, A., s. SCHMIDT-LORENZ, W. S. 45
- SAEV, G. K., s. MARKOV, K. Iw. S. 130
- SCHAUZ, K., Untersuchungen über UV-Resistenz *Saccharomyces cerevisiae*. S. 349
- SCHMIDT-LORENZ, W., und A. RIPPEL-BALDES, Wirkung des Sauerstoff-Partialdrucks auf Wachstum und Stickstoffbindung von *Azotobacter chroococcum* Beij. S. 45
- SCHMIEDEKNECHT, M., Morphologische Untersuchungen zur Frage der Rassenbildung bei *Helminthosporium papaveris* Saw. S. 404
- STEINER, M., und H. KATING, Harnstoffassimilation mit und ohne Ureasewirkung bei Mikroorganismen. (*Endomycopsis vernalis*, *Torulopsis utilis*, *Willia anomala*). S. 173
- STURM, G., Die Wirkung hoher hydrostatischer Drücke auf Süßwasser-algen. S. 109
- TERRANOVA, T., und P. DE GREGORIO, Das Bakterien/L-Formen-Verhältnis in den aus Mäusen isolierten *Proteus*- und *Salmonella*-Stämmen. S. 126
- WIELAND, Th., G. GRISS und B. HACCUS, Untersuchungen zur mikrobiellen Benzoloxxydation. I. Nachweis und Chemismus des Benzolabbaus. S. 383
- WITTMANN, H., Über die Carotinoide von *Chlorobium chlorochromatii* n. spe. S. 136